

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 58



5-6'2013

Научно-практический журнал

АНАФЕРОН ДЕТСКИЙ

ЛЕЧЕНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА ОСТРЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

- широкий спектр противовирусной активности
- влияние на продукцию и рецепцию интерферонов
- нормализация функциональной активности факторов иммунной защиты
- применяется у детей с 1 месяца жизни



анаферон
детский

Per. № 000372/01
информация для специалистов



Россия, 127473, г. Москва,
3-й Самотечный пер., дом 9
Тел./факс: (495) 684-43-33
e-mail: moffice@materiamedica.ru

www.anaferon.ru
www.materiamedica.ru

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Государственный научный
центр по антибиотикам

«Антибиотики и химиотерапия» —
ежемесячный научно-практический
журнал
Основан в 1956 году

«Antibiotics and Chemotherapy»
Published 12 times a year
Founded in 1956

АДРЕС РЕДАКЦИИ:

117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а.
ГНЦА
Тел.: 8-499-611-20-77
Факс: 8-499-611-42-38
E-mail: journalgnca@yandex.ru
Зав. редакцией Л. Б. Смирнова
Корректор: А. Н. Лобусева

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ:

Тел.: 8-499-611-20-77
Факс: 8-499-611-42-38
E-mail: gncajournal@yandex.ru
Л. И. Гусак

Подписка по каталогу Роспечать:

- индекс **71404** — для индивидуальных подписчиков
- индекс **71405** — для предприятий и организаций

*Подписка через объединённый каталог
«Пресса России»:*

- индекс **10659** — для индивидуальных подписчиков
- индекс **10660** — для предприятий и организаций

Журнал зарегистрирован
в Комитете РФ по печати
Рег. свид. № 0110694 от 25 мая 1993 г.

Установочный тираж 5000 экз.
© ГНЦА 2013

ISSN 0235-2990

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

ANTIBIOTICS AND CHEMOTHERAPY

Том 58

5—6'2013

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
MONTHLY JOURNAL

Главный редактор
профессор, д. м. н. Сидоренко С. В.

Зам. главного редактора — к. м. н. Буданов С. В.
Отв. секретарь — к. м. н. Гучев И. А.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Член-корр РАМН, проф., д. м. н. Белоусов Ю. Б.
Проф., д. м. н. Белобородов В. А.
Проф. Говорун В. М.
Проф. Гомберг М. А.
Д. б. н. Даниленко В. Н.
Проф. Клишко Н. Н.
Акад. РАМН, проф., д. м. н. Лобзин Ю. В.
Проф., д. м. н. Никитин А. В.
Проф., д. х. н. Преображенская М. Н.
Проф. Руднов В. А.
Проф. Тишков В. Н.
Проф., д. б. н. Фирсов А. А.
Проф., д. м. н. Яковлев С. В.
Проф. Яроцкий С. В.

Научные редакторы

к.м.н. Кузнецова С. М.
к.б.н. Белявская И. В.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Беседнова Н. Н.	Клясова Г. А.
Бибикова М. В.	Ленёва И. А.
Васильев А. Н.	Митрохин С. Д.
Волжанин В. М.	Романцов М. Г.
Дмитриева Н. В.	Сычев Д. А.
Долгова Г. В.	Тец В. В.
Захарова Ю. А.	Цыбанев А. А.
Зуева Л. П.	Ших Е. В.
Ильина Е. Н.	

Журнал* цитируется в: *Medline; Ind Chem; Index Medicus; Ind Sci Rev; Curr Biothech Abstr; Current Contents (Life Sciences)*

Cited in: *Medline; Ind Chem; Index Medicus; Ind Sci Rev; Curr Biothech Abstr; Current Contents (Life Sciences)*

Оригинальные статьи

Тренин А. С.
Микробная модель *Halobacterium salinarum*
для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов

В помощь практикующему врачу

Черненко Т. В., Борисова Л. А., Александрова И. В.,
Рей С. И., Никитина О. В., Косолапов Д. А.
Динамика структуры возбудителей бактериемии
и сепсиса у реанимационных больных
в многопрофильном стационаре скорой помощи
Жавберт Е. С., Дугина Ю. Л., Эпштейн О. И.
Иммунотропные свойства анаферона
и анаферона детского
Демченко Е. В., Романцов М. Г.,
Григорян С. С., Коваленко А. Л.
Циклоферон в комплексе медикаментозных мероприятий
при хроническом ларингите
Попов С. В.
Рациональная антимикробная терапия
хронического бактериального простатита

Обзоры

Виноградова К. А., Булгакова В. Г.,
Полин А. Н., Кожевин П. А.
Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам:
резистомы, её объём, разнообразие и развитие
Романцов М. Г., Ершов Ф. И., Коваленко А. Л.,
Суханов Д. С., Либеранская О. М.
Лечение вирусных инфекций посредством применения
в комплексной терапии индукторов интерферона
Сидоренко С. В., Партина И. В., Агеевец В. А.
Имипенем: 30 лет терапии

Original Papers

3 Trenin A. S.
Microbial model of *Halobacterium salinarum*
for screening inhibitors of sterol biosynthesis

Guidelines for Practitioners

11 Chernenkaya T. V., Borisova L. A., Aleksandrova I. V.,
Rei S. I., Nikitina O. V., Kosolapov D. A.
Pattern Dynamics of Bacteremia
and Sepsis Pathogens in ICU Patients
of Emergency Service
17 Zhavbert E. S., Dugina Yu. L., Epstein O. I.
Immunotropic Properties of Anaferon
and Anaferon Pediatric
24 Demchenko E. V., Romantsov M. G.,
Grigoryan S. S., Kovalenko A. L.
Cycloferon in Complex Medicamentous Management
of Chronic Laryngitis
32 Popov S. V.
Rational Antimicrobial Therapy
of Chronic Bacterial Prostatitis

Reviews

38 Vinogradova K. A., Bulgakova V. G.,
Polin A. N., Kozhevnikov P. A.
Microbial Antibiotic Resistance:
Resistome, Its Volume, Diversity and Development
49 Romantsov M. G., Ershov F. I., Kovalenko A. L.,
Sukhanov D. S., Liberanskaya O. M.
Virus Infections and Interferon Inducers
in the Complex Therapy
55 Sidorenko S. V., Partina I. V., Ageevets V. A.
Imipenem: 30-Year Experience in Therapy

По страницам журналов 62 Abstracts

* Журнал входит в перечень ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук.

Микробная модель *Halobacterium salinarum* для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов

А. С. ТРЕНИН

ФГБУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» РАМН, Москва

Microbial Model of *Halobacterium salinarum* for Screening Inhibitors of Sterol Biosynthesis

A. S. TRENIN

G. F. Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Предлагается простая высокоэффективная микробная тест-система для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов (ИБС). Она основана на использовании галофильной бактериальной культуры *Halobacterium salinarum* (по прежней классификации *Halobacterium halobium*), обладающей мевалонатным путём биосинтеза стеролов и значительным сходством их биосинтеза с образованием холестерина в организме человека. ИБС в модели *H. salinarum* выявляются как соединения, подавляющие рост тест-культуры. Внесение мевалоновой кислоты — одного из ключевых интермедиатов биосинтеза стеролов, снимает ингибирующее действие многих микробных метаболитов и, таким образом, служит доказательством их влияния на ранние этапы биосинтеза стеролов, включая этап работы ГМГ-КоА редуктазы. Тест с *H. salinarum* разработан в виде микрометода, легко поддается механизации благодаря миниатюризации микробиологических процессов, выращиванию культуры в стерильных 96-луночных планшетах и использованию автоматических микропипеток. Описываемая тест-система пригодна для работы с грубоочищенными экстрактами культуральной жидкости микроорганизмов-продуцентов и может быть с успехом применена на начальных этапах поиска. Показана возможность применения теста *H. salinarum* для поиска противоопухолевых антибиотиков.

Ключевые слова: ингибиторы биосинтеза стеролов, противоопухолевые антибиотики, archaea, микробные модели поиска, мевалоновая кислота, ГМГ-КоА редуктаза, ловастатин, миниатюризация, механизация микробиологических процессов.

A highly effective and simple microbial test system for screening inhibitors of sterol biosynthesis (ISB) is described. The system is based on cultivation of the bacterial strain *Halobacterium salinarum* (former *Halobacterium halobium*), that possesses mevalonate pathway of sterol biosynthesis and is much similar in the biosynthesis to cholesterol formation in humans. In the *H. salinarum* test system the ISB were found as compounds that inhibited the test culture growth. Mevalonate which is one of the crucial intermediates of sterol biosynthesis dismissed the inhibitory effect of many microbial metabolites thus being evident of their action at the early stages of the sterol biosynthesis, including the HMG-CoA reductase stage. The *H. salinarum* test system was developed as a micromethod and could be easily mechanized by miniaturization of the microbiological procedures, cultivation in sterile 96-well plates and using automatic micropipettes and dispensers. The *H. salinarum* test system was effective in testing crude extracts of the culture broths and advantageous at early stage of screening. The use of the *H. salinarum* test system was shown possible for screening antitumor antibiotics.

Key words: inhibitors of sterol biosynthesis, antitumor antibiotics, archaea, microbial models for screening, mevalonate, HMG-CoA reductase, lovastatin, miniaturization, mechanization of microbial processes.

Введение

Микробные вторичные метаболиты — ингибиторы биосинтеза стеролов (ИБС), в первую очередь статины — ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы (ГМГ-КоА редуктазы), хорошо зарекомендовали себя в лечении и профилактике атеросклероза [1—3]. Среди ингибиторов более поздних этапов биосинтеза стеролов, большой интерес представляют ингибиторы сквален-синтазы, сквален-эпоксидазы, ряда других ферментов, перспективные для лечения сер-

дечно-сосудистых заболеваний [4—6], а также ингибиторы Р-450 зависимой деметилазы ланостерола, являющиеся действенным средством лечения грибковых инфекций [7, 8]. Многие ИБС, независимо от особенностей своего механизма действия, обладают также противоопухолевой активностью и высоко оцениваются в качестве лекарственных препаратов для лечения онкологических заболеваний [9]. В настоящее время развернут широкий поиск ИБС среди продуктов жизнедеятельности различных микроорганизмов, как грибов, так и актиномицетов [10, 11]. Успех поисковых работ во многом зависит от эффективности применяемых тест-систем, в особенности на начальном этапе отбора.

© А. С. Тренин, 2013

Адрес для корреспонденции: 119021 г. Москва, Большая Пироговская, 11. ФГБУ НИИНА

Возможность применения ферментных систем, требующих тщательной химической очистки тестируемых препаратов, на начальных этапах скрининговых исследований весьма затруднительна. По-видимому, более уместным здесь оказывается использование клеточных культур. Предложенный нами ранее метод отбора ИБС с помощью культуры клеток гепатобластомы G2 (Нер G2), основанный на проведении количественной оценки включения радиоизотопных предшественников в холестерин и отдельные фракции липидов [12], позволяет выявлять важные особенности механизма действия отбираемых микробных метаболитов, однако отличается весьма высокой трудоёмкостью. Микробная тест-система, основанная на использовании грибной культуры *Acremonium fusidioides*, образующей антибиотик стероидной структуры фузидин [13], обладает значительно меньшей трудоёмкостью, однако требует использования дополнительных процедур для биологического тестирования продукции фузидина, что, в целом, несколько усложняет процесс выявления ИБС. Кроме того, наличие у многих микробных метаболитов выраженной противогрибковой активности существенно затрудняет их оценку в указанном тесте.

В последнее время большой интерес исследователей привлекает к себе археобактерии — уникальная группа микроорганизмов, способных к росту в экстремальных условиях внешней среды, включающих в себя повышенную температуру, рН, солёность питательной среды. Для роста большинства представителей рода *Halobacterium*, например, требуется, чтобы содержание соли (NaCl) в среде превышало 15% [14].

Несмотря на то что клетки археобактерий структурно относятся к прокариотному типу, многие их биохимические процессы существенно отличаются от процессов, присущих бактериям, сближая указанную группу с высшими — эукариотными организмами [15]. Несколько видов галофильных археобактерий являются отличными модельными организмами, используемыми для изучения многих биологических вопросов, включая поддержание структуры и репликацию хромосом, регуляцию транскрипции, экспорт и деградацию белков [14, 15]. Они могут быть применены также для разработки моделей поиска биологически активных соединений.

Уникальной и вместе с тем весьма удобной биологической моделью, позволяющей изучать действие препаратов, способных к подавлению ГМГ-КоА редуктазы, является галофильная археобактерия *Halobacterium salinarum*.

Синтез её липидов осуществляется по мевалонатному, а не по более обычному для бактерий — малонатному пути. По мевалонатному пути, таким образом, происходит образование основного

стероидного компонента мембраны *H. salinarum* — диэфира фитанилфосфатидилглицеролфосфата [16,17].

ГМГ-КоА редуктаза *H. salinarum* состоит из двух идентичных субъединиц и значительно уступает по молекулярной массе (М 62.500) соответствующим ферментам позвоночных, а также аналогичным ферментам бактерий, обладающих мевалонатным путём биосинтеза стеролов. Вместе с тем в отличие от бактериального фермента, требующего для своей работы НАДН, ГМГ-КоА редуктаза *H. salinarum*, подобно ферменту человека, требует НАДФН. При этом известный ингибитор ГМГ-КоА редуктазы человека монаколинновый антибиотик ловастатин оказывается конкурентным ингибитором соответствующего фермента у *H. salinarum* ($K_i = 20$ нМ) [15—17].

Отличительные особенности в регуляции биосинтеза стеролов в клетках человека и *H. salinarum* таковы, что в человеческих клетках действие ингибиторов ГМГ-КоА редуктазы вызывает лишь некоторое снижение уровня ХС. В то же время у археобактерий действие подобных ингибиторов может привести к полному подавлению роста клеток, поскольку блокируется образование изопреноидных липидов — основного компонента клеточных мембран [17].

Приведённые сведения позволяют оценить возможность использования *H. salinarum* для проведения поиска ИБС.

В настоящем исследовании на основе *H. salinarum* разработана модель поиска ИБС, где соответствующие микробные метаболиты выявляются как соединения, подавляющие рост тест-культуры. Внесение мевалоновой кислоты — одного из ключевых интермедиатов биосинтеза стеролов, снимает ингибирующее действие многих микробных метаболитов и, таким образом, служит доказательством их влияния на ранние этапы биосинтеза стеролов, включая этап работы ГМГ-КоА редуктазы. Тест с *H. salinarum* разработан в виде микрометода, выращивание культуры проводится в стерильных 96-луночных планшетах. Благодаря миниатюризации микробиологических процессов, и использованию автоматических микропипеток тест легко поддается механизации. Показана возможность применения теста *H. salinarum* для поиска противоопухолевых антибиотиков.

Материал и методы

Условия культивирования, среды, определение биологической активности. Культуры актиномицетов и грибов выделяли из образцов почвы и выращивали при температуре 28°C на агаризованных средах: актиномицеты — на среде Гаузе 1 и Гаузе 2 [18], грибы — на сусло-агаре и кислом агаре Чапека [19].

Для изучения антибиотической активности культур в жидкой питательной среде их выращивали в колбах Эрленмейера ёмкостью 750 мл, содержащих 50—150 мл питательной

среды, на качалках при 28°C в течение 5–11 суток в различных питательных средах (в %): Гаузе 2 (глюкоза — 10,0, пептон — 5,0, триптон — 5,0, NaCl — 5,0, CaCO₃ — 2,5), соево-глицериновой (соевая мука — 1,5, глицерин — 3,0, NaCl — 0,3, CaCO₃ — 0,3), соево-глюкозной (соевая мука — 1,0, глюкоза — 1,0, NaCl — 0,5, CaCO₃ — 0,25), соево-сахарозной (соевая мука — 1,0, сахароза — 2,0, CaCO₃ — 0,3, NaCl — 0,3, KNO₃ — 0,2), кукурузно-крахмальной (кукурузный экстракт — 0,3, крахмал — 2,0, CaCO₃ — 0,5, NaCl — 0,5, KNO₃ — 0,4). В качестве инокулята использовали выращенную на агаризованных средах 7–10-суточную культуру. Рост культур в жидкой среде контролировали спектрофотометрически по уровню поглощения при 560 нм.

Антибиотическую активность определяли методом штриха на агаровой среде при выращивании продуцентов на плотных питательных средах и методом диффузии в агаре при выращивании в жидких средах — в отношении различных бактериальных тест-микроорганизмов и грибов: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 21027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Cryptococcus humicola* ATCC 9949, *Aspergillus niger* ATCC 16404 и *Fusarium oxysporum* VKM F-140 (= CMI, IMI 90473).

Для культуры *H. salinarum* использованы следующие питательные среды (в %): среда 1 (NaCl — 15,6; MgCl₂×6H₂O — 1,3; MgSO₄×7H₂O — 2,0; CaCl₂×2H₂O — 0,1; KCl — 0,4; NaHCO₃ — 0,02; NaBr — 0,05; дрожжевой экстракт — 0,5; глюкоза — 0,1; вода — до 100; pH — 7,0); среда 2 (NaCl — 25,0; MgCl₂×6H₂O — 2,0; CaCl₂×2H₂O — 0,02; KCl — 0,2; гидролизат казеина — 0,5; дрожжевой экстракт — 0,5; вода — до 100; pH — 7,4); среда 3 (NaCl — 25,0; MgSO₄×7H₂O — 0,1; K₂HPO₄ — 0,1; дрожжевой экстракт — 1,0; вода — до 100; pH — 7,0–7,2); среда 4 (NaCl — 18,0; MgSO₄×7H₂O — 0,1; K₂HPO₄ — 0,1; дрожжевой экстракт — 1,0; вода — до 100; pH — 7,0–7,2). Плотные питательные среды содержали 2% агара.

Препараты антибиотиков, реактивы и материалы. В работе использовали следующие препараты антибиотиков: Ногамицин, «Upjohn», США; Стрептонигрин, «Pfizer», США; Актиномицин D предоставлен Институтом антибиотиков, Йена, Германия; Олеандомицин и Виомицин, Pfizer, США; Спектиномицин и Новобиоцин, «Upjohn Co», США; Пуромицин, «Nutritional Biochem. Co», Cleveland, США; Ловастатин, «Merck Sharp & Dohme», США; Полимиксин М, Полимиксин В, Хлорамфеникол, Олигомицин, Этамицин, Неомицин, Канамицин, Амикацин и Амфотерицин «Sigma», США; Ванкомицин, «Eli Lilly», США; D-циклосерин, «Manu. Res. Lab.», N.Y., США; Бацитрацин и Бензилпенициллин, «Serva», Германия; Мономицин и Оливомицин, Россия; Ампициллин, Тетрациклин и Гелиомицин (резистомицин), «Биосинтез», Пенза; Грамицидин S, «Красфарм», РФ; Ампициллин тригидрат, Усолье, Россия; Лизоцим, Доксидин, Тетрациклин, Гентамицин, Оксациллин, Клоксациллин и Диклоксациллин, Россия, Москва; Амфотерицин В, ВНИИ-ТИАФ, Москва; Стрептогитрин предоставлен ИБХ РАН, Москва, и антибиотики, полученные непосредственно в НИИ-ИНА им. Г. Ф. Гаузе, РАМН: Брунеомицин, Даунорубин, Доксорубин, Карминомицин, Блеомицин, Этамицин, Рифамицин SV, Рифампицин, Ристамицин, Эремомицин, а также препараты ряда новых антибиотиков не установленной химической структуры.

Используемый в тест-системе препарат лактона D,L-мева-лоновой кислоты («Sigma», США) подвергали сапонификации — выдерживали в слабощелочной среде для получения кислотной формы: 1 М раствор лактона в 0,1 н NaOH инкубировали при 50°C в течение 2 часов, либо при 37°C в течение 4 часов.

Контрольным препаратом при выявлении ИБС служил ловастатин («MSD», США).

Для стерилизации проб культуральной жидкости применяли одноразовые стерильные фильтры Sterivex (диаметр пор 0,22 мкм) фирмы «Millipore», США. В целях концентрирова-

ния препаратов культуральной жидкости проводили их лиофилизацию на лиофилизационной установке SUE 300 Q («Нето», Швеция).

Выделение и очистка антибиотиков. Проведено, как описано ранее [12, 13] Культуральную жидкость и мицелий продуцентов разделяли фильтрацией или центрифугированием. Выделение антибиотиков из фильтрата культуральной жидкости проводили сорбцией на смоле Амберлит XAD-2, или экстракцией этилацетатом при кислотом (4,0) и нейтральном значениях pH. Полученный после упаривания в вакууме осадок растворяли в небольшом объеме 60% EtOH. Экстракцию антибиотиков из мицелия проводили 80% EtOH.

Хроматографическую очистку и разделение компонентов перспективных препаратов проводили методом колоночной хроматографии. Определяли физико-химические характеристики полученных соединений. Для идентификации выделенных антибиотических веществ использовали компьютерную базу данных природных биологически активных веществ (BNPD), разработанную Я. Берди (Венгрия).

Микробная модель *H. salinarum*. Культуру *Halobacterium salinarum* (*Halobacterium halobium* ATCC 29341) поддерживали пересевами в агаризованной среде №4 при температуре 37°C в течение 7 суток. При постановке эксперимента культуру переносили в одну из жидких питательных сред приведенного выше состава с повышенным содержанием NaCl. Работу с микробным тестом *H. salinarum* проводили в виде двух вариантов — макро- и микрометода. При использовании макрометода культивирование *H. salinarum* производили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 50 мл питательной среды, или пробирках объемом 25 мл, содержащих 5 мл питательной среды, на качалке при 120 об/мин в темноте при температуре 37°C. Рост *H. salinarum* контролировали спектрофотометрически в микрокалориметре МКМФ-1 (Россия) в 1 см кюветках при 540 нм. В качестве посевного материала использовали культуру, выращенную на агаризованных питательных средах в течение 1 недели. Снятые с агаризованных питательных сред клетки суспендировали в жидкой питательной среде с использованием вибратора «Вортекс ЕЛМИ» (Латвия). Начальная оптическая плотность культуры при засеве жидкой питательной среды составляла 0,005–0,015. Исследуемые препараты вносили в среду культивирования *H. salinarum* из расчета 10 мкл на 1 мл среды. Выращивание производили до оптической плотности 0,20–0,30.

При использовании микрометода выращивание микробной культуры проводили в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах с круглым дном, предназначенных для проведения иммунологических реакций («Медполимер», С-Пб.). Объем питательной среды в каждой лунке (пробе) составлял 150 мкл. Инкубирование проводили в термостате при 37°C в течение 5–22 суток. Для предотвращения высыхания проб в термостате создавали условия повышенной влажности. В качестве посевного материала использовали культуру *H. salinarum*, выращенную на агаризованных питательных средах в течение 1 недели. Клетки суспендировали в жидкой питательной среде с использованием вибратора «Вортекс ЕЛМИ» (Латвия) и разводили питательной средой до нужного объема. Начальная оптическая плотность посевного материала, контролируемая в микрокалориметре МКМФ-1 (Россия), составляла 0,005–0,015 (в 1 см кюветках при 570 нм).

Препарат мевалоновой кислоты вносили в конечной концентрации 1⁻¹⁰ мМ непосредственно в питательную среду в начале культивирования.

Исследуемые препараты, полученные из культуральной жидкости и мицелия продуцентов, вносили в среду культивирования *H. salinarum* в виде спиртовых растворов. Тестированию подвергали также препараты, прошедшие различные стадии химической очистки. Испытуемые соединения добавляли в виде сконцентрированных в 50–100 раз спиртовых растворов, а также серии полученных из исходного концентрата последовательных трёхкратных разведений в том же растворите-

ле (спирт). Препарат в каждой концентрации вносили в 2–3 повторах. При внесении в каждую ячейку препарата из расчёта 3 мкл на 150 мкл среды конечное содержание этанола в эксперименте не превышало 2%. Анализу подвергали также непосредственно культуральную жидкость продуцентов, прошедшую стерилизационную обработку микрофильтрацией. В этом случае серию последовательных разведений проводили в стерильной дистиллированной воде.

Концентрацию препаратов рассчитывали в единицах активности культуральной жидкости (ед. кж/мл) (для первичных экстрактов антибиотиков), а также в мкг/мл (для очищенных препаратов-сырцов и препаратов антибиотиков). Препаратом сравнения служил ловастатин.

Оценку роста при использовании микрометода проводили фотометрически с помощью микроплетфотометра вертикального сканирования (ИФКО-2, Россия) после перемешивания содержимого лунок, а также визуально, оценивая рост клеток *H.salinarum* в виде плотного осадка красного цвета на дне лунки.

О наличии у испытуемых препаратов способности к ингибированию биосинтеза стеролов судили по подавлению роста культуры.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием компьютерных программ Statgraf и Microsoft Excel, рассчитывая средние арифметические значения, доверительные интервалы и стандартное отклонение. Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Выбор *H.salinarum* в качестве модели для отбора ИБС основан на том, что у этой культуры биосинтез стеролов протекает по мевалонатному пути, аналогичному пути биосинтеза в организме млекопитающих, для роста культуры требуются высокое содержание NaCl и для поддержания целостности клеток в таких условиях им необходима полноценная липидная мембрана. Подавление биосинтеза стеролов и связанное с этим нарушение целостности клеточных мембран приводит к лизису клеток.

При наличии несомненного сходства с эукариотными организмами в целом, у галобактерий имеется ряд существенных отличий. Они касаются в первую очередь свойств основного фермента биосинтеза стеролов — ГМГ-КоА редуктазы, а также некоторых аспектов регулирования биосинтеза стеролов.

При регулировании биосинтеза стеролов у эукариотных организмов избыток или недостаток конечного продукта — ХС и его основного интермедиата — мевалоновой кислоты — приводит к изменению активности ГМГ-КоА редуктазы, меняется также концентрация фермента. Поэтому в клетках эукариотов, у которых известный ингибитор этого фермента — ловастатин конкурентно ингибирует ГМГ-КоА редуктазу, внесение антибиотика сопровождается одновременным увеличением измеряемой активности фермента, происходящим, по-видимому, за счёт стимуляции его синтеза *de novo* [16].

Регуляция биосинтеза стеролов у галобактерий идет несколько иным способом — возможно

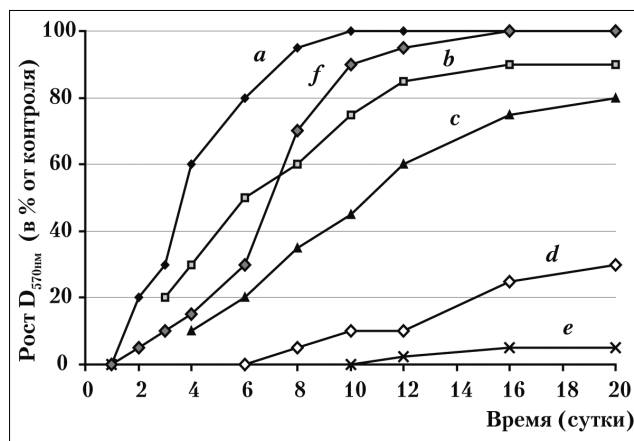


Рис. 1. Рост *H.salinarum* в присутствии ловастатина и мевалоната.

Концентрация ловастатина (мкг/мл): 0 (a), 0,3 (b), 0,6 (c), 1,25 (d, f), 2,5 (e). Концентрация мевалоната (мМ): 0 (a, b, c, d, e), 3 (f). Ось абсцисс — время (сутки); ось ординат — рост, D_{570nm} (в % от контроля).

в некоторой степени за счёт изменения внутриклеточной концентрации субстрата реакции — ГМГ-КоА. При этом никакого изменения активности фермента ГМГ-КоА редуктазы, а также изменения его содержания в клетках не происходит [17]. Следовательно, в человеческих клетках ингибиторы ГМГ-КоА редуктазы способны лишь несколько снизить уровень ХС, а у архебактерий они могут полностью подавить рост клеток, блокируя образование изопrenoидных липидов — основного компонента клеточных мембран.

Приведённые сведения позволяют использовать *H.salinarum* для изучения мевалонатного синтеза на молекулярном уровне и, что, особенно важно, взять за основу для разработки моделей поиска ИБС.

Активный рост тест-культуры *H.salinarum* начинался на 2–3 сутки культивирования. Внесение ловастатина в тест-систему приводило к подавлению или задержке роста тест-культуры. Наблюдаемый эффект зависел от концентрации антибиотика и возрастал с увеличением дозы препарата (рис. 1, кривые a–e). Использование ловастатина в концентрации 2,5–10 мкг/мл приводило к полному подавлению роста (рис. 1, кривая e) и лизису клеток. Известно, что ингибиторы отдельных этапов биосинтеза стеролов могут вызвать нарушение целостности мембран [20]. В гипертонических условиях питательной среды, необходимой для выращивания *H.salinarum*, подобное нарушение целостности мембран должно приводить к лизису клеток, что и наблюдалось в условиях эксперимента. Поэтому препараты, способные вызывать лизис клеток *H.salinarum*, рассматривались нами в качестве потенциальных ИБС.

Внесение в тест-систему экзогенной мевалоновой кислоты ($1 \cdot 10^{-10}$ мМ) приводило к тому, что

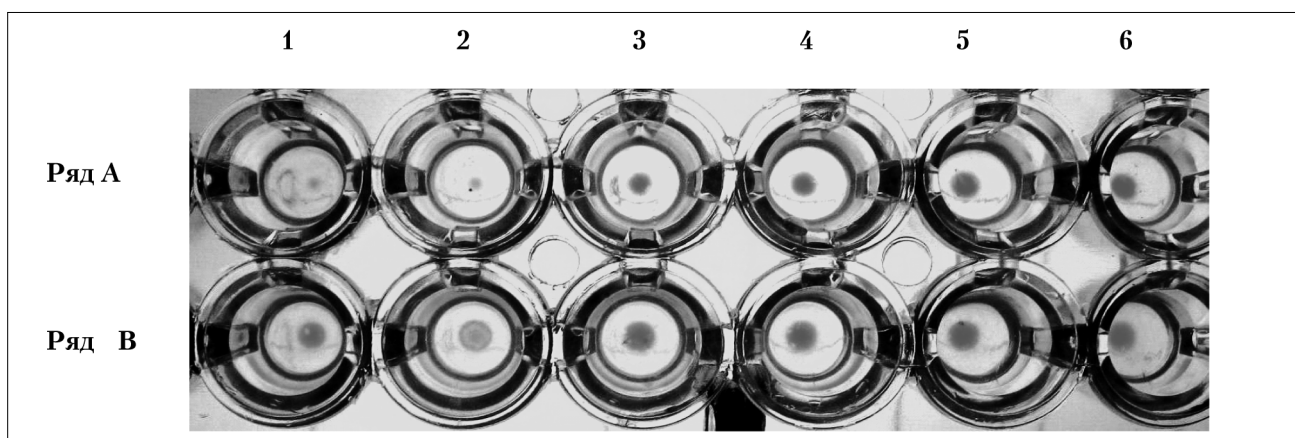


Рис. 2. Рост *H. salinarum* в ячейках планшета в присутствии ловастатина и мевалоната (микрометод).

Концентрация ловастатина в ячейках каждого ряда (слева — направо, в мкг/мл): 5 (1-я ячейка), 2,5 (2-я), 1,25 (3-я), 0,6 (4-я), 0,3 (5-я), 0 (6-я); концентрация мевалоната: верхний ряд А — 0; нижний ряд В — 3 мМ; Продолжительность культивирования — 16 сут.

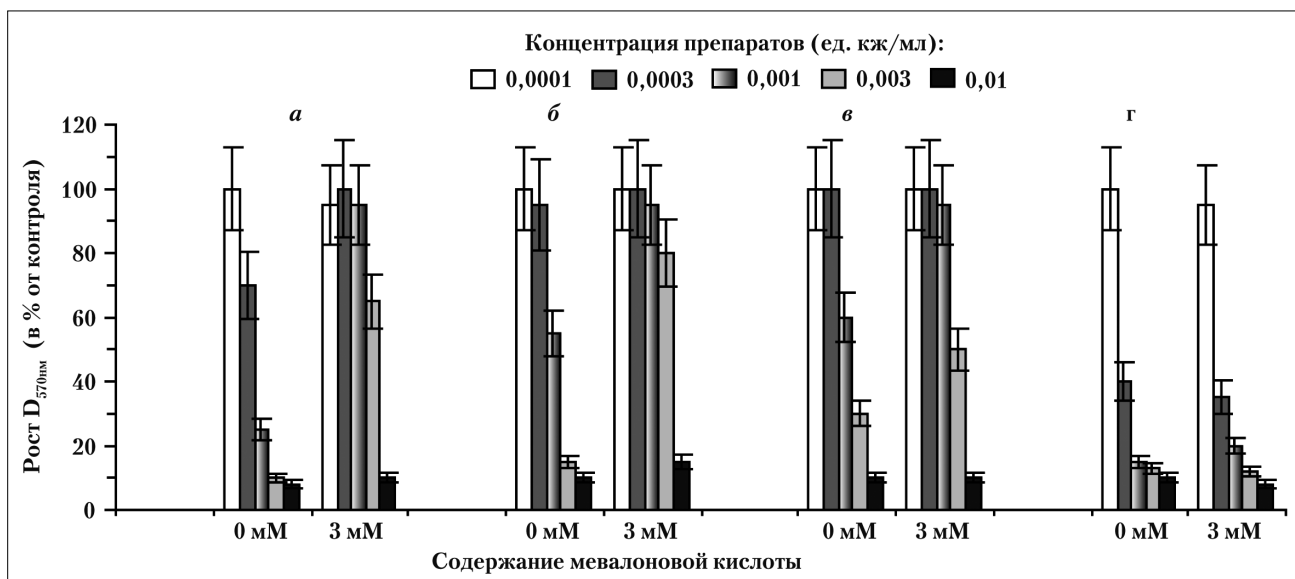


Рис. 3. Влияние мевалоновой кислоты на рост *H. salinarum* в присутствии экстрактов, полученных из культуральной жидкости штаммов 13/88 (а), 1709 (б), 55/90 (в) и 199/88 (г).

Продолжительность культивирования — 16 сут. Ось абсцисс — содержание мевалоновой кислоты; ось ординат — рост, $D_{570\text{ нм}}$ (в % от контроля). Обозначение столбиков — концентрация препаратов (ед. кж/мл).

рост культуры *H. salinarum* происходил в присутствии ловастатина (рис. 1, сопоставление кривых *f* и *d*). Мевалонат (3 мМ) снимал подавляющее действие ловастатина вплоть до концентрации последнего 2,5—5 мкг/мл (6—12 мкМ).

Влияние ловастатина и мевалоновой кислоты на рост *H. salinarum* показано на фотографии, демонстрирующей результаты культивирования *H. salinarum* в ячейках 96-луночного полистиролового планшета (рис. 2). В лунках верхнего ряда заметно подавление роста *H. salinarum* ловастатином, полное или частичное в зависимости от концентрации препарата (лунки 1А—4А). В нижнем ряду, содержащем мевалоновую кислоту, такого подавления не происходит. В лунках 1В—4В, содержа-

щих ловастатин в концентрации 5—0,6 мкг/мл, имеет место активный рост тест-культуры, демонстрирующий снятие мевалонатом подавляющего действия ловастатина.

Подавление роста *H. salinarum* наблюдалось при анализе грубых экстрактов и очищенных препаратов, получаемых из культуральной жидкости и мицелия различных продуцентов. Внесение в тест-систему экзогенной мевалоновой кислоты в ряде случаев приводило к возобновлению роста *H. salinarum*, что свидетельствовало о подавлении этими метаболитами начальных (т. е. до образования мевалоната) этапов биосинтеза стеролов (рис. 3, а—в). Действие других препаратов, напротив, в присутствии мевалоната не снима-

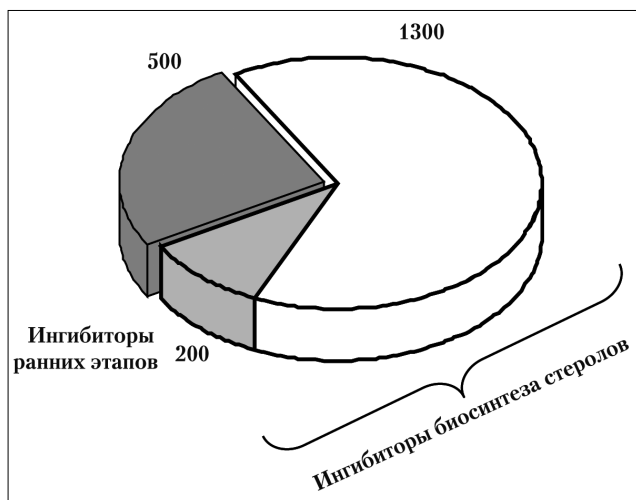


Рис. 4. Способность микробных штаммов-продуцентов к подавлению биосинтеза стеролов в модели *H.salinarum*.

лось (рис. 3, г), что расценивалось как их неспособность подавлять ранние этапы биосинтеза стеролов.

Предложенная тест-система была применена для исследования свыше 2000 штаммов актиномицетов и плесневых грибов, проявивших на предварительных этапах противогрибковую активность. У большинства метаболитов (1500 штаммов или 75%) выявлена способность к подавлению роста *H.salinarum*. При этом у 600 штаммов подавление было значительным, т. е. наблюдалось при испытании сильно разведённых (в 100–1000 раз) препаратов культуральной жидкости и мицелия продуцентов.

Подавление роста *H.salinarum* снималось в присутствии экзогенной мевалоновой кислоты у 200 штаммов (13% от числа активных штаммов), что было доказательством воздействия образуемых ими метаболитов на ранние этапы биосинтеза стеролов. Среди оставшихся 1300 культур большинство, по-видимому, образуют метаболиты, действующие на поздние этапы биосинтеза стеролов (рис. 4).

Таким образом, ИБС при использовании модели *H.salinarum* выявляются как соединения, подавляющие рост продуцента. Рассматриваемая модель пригодна для работы с грубоочищенными экстрактами, полученными из культуральной жидкости и мицелия микроорганизмов-продуцентов, филтратами культуральной жидкости и может быть с успехом использована на начальных этапах поиска. Возможность применения в микробной модели *H.salinarum* мевалоновой кислоты позволяет уже на начальных этапах поиска успешно выявлять метаболиты, способные к подавлению ранних этапов биосинтеза стеролов.

Применение модели для поиска противоопухолевых антибиотиков. Для широкого и полноцен-

ного использования *H.salinarum* в поисковой работе необходимо было определить чувствительность этой культуры к различным антибиотикам и, таким образом, выяснить возможность применения указанной модели для поиска соответствующих биологически активных веществ, в том числе, возможно, не относящихся непосредственно к группе ИБС.

С этой целью было изучено действие на указанную модель 52 антибиотиков, относящихся к различным классам биологически активных соединений (таблица). В подавляющем большинстве антибиотики не проявляли высокой активности в отношении микробной модели *H.salinarum*. Практически неактивны ингибиторы синтеза белка и ингибиторы биосинтеза клеточной стенки (МПК свыше 130, 250 и 600 мкМ). Из ингибиторов синтеза клеточной стенки некоторую активность удалось обнаружить у бацитрацина, гликопептидных антибиотиков ванкомицина, ристомидина и эремидина, однако только при использовании, так называемой, «мягкой» оценки минимальной подавляющей концентрации (МПК), допускающей частичный рост тест-культуры (МПК-2). Слабой активностью (МПК 20–60 мкМ) обладали ингибиторы ДНК-зависимой РНК-полимеразы рифамицин SV и рифампицин.

Умеренной активностью обладали такие дезорганизаторы мембран, как полимиксины В и М, амфотерицин В. Вместе с тем заметная активность обнаружена у грамицидина S, гелиомицина, амфомицина и новобиоцина (МПК 3–6 мкМ). Эти препараты, как известно, обладают способностью к образованию комплексов с ионами Mg^{2+} и, таким образом, могут подавлять активность многих ферментов [21]. Умеренную активность проявляет ингибитор АТФ-азы — олигомицин (МПК 6 мкМ).

Высокой активностью в отношении *H.salinarum* обладает ловастатин (МПК 3 мкМ), а также противоопухолевые антибиотики митомицин С, стрептонигрин (брунеомицин), актиномицин D, антрациклиновые антибиотики карминомицин и ногаламицин (МПК от 1,4 до 4,0 мкМ). В отличие от ловастатина, действие указанных препаратов не снимается в присутствии мевалоновой кислоты. Способность противоопухолевых антибиотиков доксорубицина, даунорубицина и винкристина к подавлению роста *H.salinarum* была отмечена также зарубежными исследователями [22].

Таким образом, изучение различных препаратов позволяет считать бактериальную модель *H.salinarum* полезной для поиска не только ИБС, но также ряда других биологически активных соединений, в первую очередь противоопухолевых антибиотиков.

Применение описываемой микробной модели в скрининге новых антибиотиков в НИИНА

Активность различных антибиотиков в отношении бактериальной культуры *H.salinarum*

№ п/п	Соединение	МПК, мкМ	
		МПК-1 ¹	МПК-2 ²
Ингибиторы синтеза клеточной стенки			
1	Бензилпенициллин	>800	>800
2	Оксациллин	>800	>800
3	Клоксациллин	800	300
4	Диклоксациллин	400	200
5	Ампициллин	>800	800
6	Эремомицин	130	32
7	Ванкомицин	130	32
8	Ристомидин	200	64
9	Цефалоридин	>800	>800
10	Бацитрацин	120	32
11	D-циклосерин	>800	>800
12	Лизоцим	>50	>50
Ингибиторы синтеза белка			
13	Неомицин	>800	>800
14	Канамицин	>800	>800
15	Амикацин	>800	>800
16	Гентамицин	>800	>800
17	Тобрамицин	>800	>800
18	Стрептотрицин	>800	>800
19	Пуромицин	>400	130
20	Хлорамфеникол	600	300
21	Тетрациклин	250	80
22	Доксициклин	160	80
23	Олеандомицин	>600	>600
24	Виомицин	>800	800
25	Спектиномицин	200	100
26	Мономицин	>800	600
27	Эритромицин	>500	130
Антибиотики, действующие как дезорганизаторы мембран			
28	Амфотерицин В	40	4
29	Нистатин	60	8
30	Полимиксин М	20	2,5
31	Полимиксин В	12	2,5
32	Этамицин	>600	300
33	Грамицидин S	6	0,7
Противоопухолевые антибиотики — ингибиторы синтеза НК			
34	Стрептонигрин	2	0,3
35	Триметоприм	80	40
36	Блеомицетин	80	16
37	Актиномицин D	2	0,7
38	Доксорубидин	20	5
39	Карминомицин	2	0,3
40	Даунорубидин	16	4
41	Ногаламицин	4	1
42	Митомицин С	1,4	0,2
43	Оливомицин	5	1
44	Винкристин	6	0,8
45	Винбластин	30	6
Ингибиторы ДНК-зависимой РНК-полимеразы			
46	Рифамицин SV	40	5
47	Рифампицин	50	6
Ингибитор АТФ-азы			
48	Олигомицин	6	1,5
Антибиотики с неясным механизмом действия			
49	Гелиомицин	0,4	0,2
50	Новобиоцин	3	0,3
51	Амфомицин	3	1,5
Ингибитор гидрокси-метилглутарил-КоА редуктазы (ГМГ-КоА редуктазы)			
52	Ловастатин	3	0,7

Примечание. ¹ МПК-1 — определена как минимальная концентрация препарата, полностью предотвращающая рост тест-культуры; ² МПК-2 — определена как минимальная концентрация препарата, при которой происходит подавление роста на 50%.

им. Г. Ф. Гаузе РАМН позволило выделить продуценты различных ИБС, как среди несовершенных и высших грибов [23, 24], так и среди актиномицетов, в том числе такие антибиотики, как антибиотик 1132 (хлоротрицин) [25], антибиотик 1278 из группы ирумамицина, обладающий высокой противогрибковой активностью [26], антибиотиков стероидной (55/90) и монаколиновой структуры (13/88-2) [27, 28], а также ряда других соединений, находящихся в настоящее время в стадии углубленного изучения.

В сравнении с ранее предложенной моделью поиска ИБС с использованием клеток Нер G2 новая микробная модель *H.salinarum* обладает несравненно более высокой пропускной способностью. По этому показателю она значительно превосходит также микробную модель *A.fusidioides*. Предлагаемая тест-система малочувствительна к микробному заражению, а вследствие выращивания культуры в стерильных 96-луночных планшетах и использования автоматических микропипеток, легко поддается механизации. Результаты микробного теста хорошо сочетаются с оценкой ингибирующего действия метаболитов в тестах с клетками человека: все метаболиты, активные в тесте Нер G2, оказались активными в микробной модели, а среди метаболитов, неактивных в микробной модели, не было ни одного, который бы проявил свою активность в тесте Нер G2. Следовательно, бактериальная модель *H.salinarum*, подобно ранее предложенной микробной модели *A.fusidioides*, не дает ложноотрицательных результатов, и её применение практически не вызывает неправомерного отсева потенциально перспективных культур.

Заключение

Таким образом, ИБС при использовании модели *H.salinarum* выявляются как соединения, подавляющие рост тест-культуры. Рассматриваемая модель пригодна для работы с грубоочищенными экстрактами, полученными из культуральной жидкости и мицелия микроорганизмов-продуцентов, а также самой культуральной жидкости микроорганизмов продуцентов, и может быть с успехом использована на начальных этапах поиска. Возможность применения в микробной модели *H.salinarum* мевалоновой кислоты позволяет уже на начальных этапах поиска успешно выявлять метаболиты, способные к подавлению ранних этапов биосинтеза стеролов. Чувствительность модели к большинству противоопухолевых антибиотиков позволяет высоко оценивать перспективность её использования для проведения поиска противоопухолевых антибиотиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тренин А. С., Камруха Г. С. Антибиотики — ингибиторы биосинтеза холестерина. Химфарм ж-л 1997; 31: 9: 5—16.
2. Тренин А. С. Вторичные метаболиты грибов — ингибиторы биосинтеза стеролов. Прикладная биохимия и микробиология 1998; 34: 2: 131—138.
3. Trapani L., Segatto M., Pallottini V. Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: The liver as a metabolic «power station». World J Hepatol 2012; 4: 6: 184—190.
4. Seiki S., Frishman W. H. Pharmacologic inhibition of squalene synthase and other downstream enzymes of the cholesterol synthesis pathway: a new therapeutic approach to treatment of hypercholesterolemia. Cardiol Rev 2009; 17: 2: 70—76.
5. Chugh A., Ray A., Gupta J. B. Squalene epoxidase as hypocholesterolemic drug target revisited. Prog Lipid Res 2003; 42: 1: 37—50.
6. Belter A., Skupinska M., Giel-Pietraszuk M. et al. Squalene monooxygenase — a target for hypercholesterolemic therapy. Biol Chem 2011; 392: 12: 1053—1075.
7. Espinel-Ingroff A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005—2009). Rev Iberoam Micol 2009; 26: 1: 15—22.
8. Kathiravan M. K., Salake A. B., Chothe A. S. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. Bioorg Med Chem 2012; 20: 19: 5678—5698.
9. Garcia-Ruiz C., Morales A., Fernandez-Checa J. C. Statins and protein prenylation in cancer cell biology and therapy. Anticancer Agents Med Chem 2012; 12: 4: 303—315.
10. Hatori H., Sato B., Sato I. et al. FR901512, a novel HMG-CoA reductase inhibitor produced by an agonomycetous fungus No. 14919. II. Taxonomy of the producing organism, fermentation, isolation and physico-chemical properties. J Antibiot (Tokyo) 2004; 57: 4: 264—270.
11. Donadio S., Maffioli S., Monciardini P. et al. Sources of novel antibiotics — aside the common roads. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 88: 6: 1261—1267.
12. Тренин А. С., Терехова Л. П., Толстых И. В. и др. Отбор микробных вторичных метаболитов — ингибиторов биосинтеза холестерина с помощью культуры клеток гепатобластомы G2. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 1: 3—8.
13. Тренин А. С. Микробная тест-система для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов. Антибиотики и химиотер 2013; 58: ? : ?—?.
14. Ventosa A., Nieto J. J., Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 2: 504—544.
15. Soppa J. From genomes to function: *Haloarchaea* as model organisms. Microbiology 2006; 152: 3: 585—590.
16. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. Biochemistry, 5th Edition: International Version. W. H. Freeman and Company, New York. 2002; 1100 pp.
17. Cabrera J. A., Bolds J., Shields P. E. et al. Isoprenoid synthesis in *Halobacterium halobium*. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme concentration in response to mevalonate availability. J Biol Chem 1986; 261: 8: 3578—3583.
18. Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П., Свешиникова М. А. и др. Определитель актиномицетов. М.: 1983; 245.
19. Waksman S. A. The Actinomycetes. Classification, Identification and Descriptions of Genera and Species. Vol. 2. The Williams and Wilkins Co, Baltimore. 1961; 363 pp.
20. Fitch M. E., Mangels A. R., Altmann W. A. et al. Microbiological screening of mevalonate-suppressive minor plant constituents. J Agric Food Chem 1989; 37: 687—691.
21. Lancini G., Parenti F., Gallo G. G. Antibiotics — a multidisciplinary approach. Plenum Press, New York. 1995; 278.
22. Sioud M., Baldacci G., Forterre P., de Recondo A. M. Antitumor drugs inhibit the growth of halophilic archaeobacteria. Eur J Biochem 1987; 169: 2: 231—236.
23. Терехова Л. П., Тренин А. С., Озерская С. М. и др. Образование аскофуранона культурой гриба *Paecilomyces variotii* Bainier 199. Микробиология 1997; 66: 5: 611—615.
24. Тренин А. С., Цвигун Е. А., Соболева Н. Ю. и др. Антимикробная и гиполипидемическая активность штаммов *Lentinus edodes* и *Ganoderma lucidum*. Иммунопатология, аллергология, инфектология. Труды междисциплинарного микологического форума: Грибные биотехнологии в медицине и промышленности. 2010; 1: 270.
25. Терехова Л. П., Галащенко О. А., Тренин А. С. и др. Выделение и изучение антибиотика ИНА-1132 (хлоротрицина), образуемого штаммом *Streptomyces baarnensis*. Антибиотики и химиотер 2008; 53: 5—6: 3—7.
26. Shashkov A. S., Tsvetkov D. E., Lapchinskaya O. A. et al. Structure, ¹H and ¹³C NMR spectra, and biological activity of the antibiotic INA-1278 related to irumamycin and produced by the experimental *Streptomyces* sp. strain No. 1278. Russ Chem Bull, Int Ed 2011; 60: 11: 2412—2417.
27. Тренин А. С., Цвигун Е. А., Терехова Л. П. и др. Микробные модели в поиске ингибиторов биосинтеза атеросклероза. Тез. докл. I Всероссийской конференции по проблемам атеросклероза. М.: 1999; 167.
28. Trenin A. S., Lapchinskaya O. A., Pogozheva V. V. et al. Antifungal activity of natural compounds produced by mutant strains of *Amycolatopsis orientalis* subsp. *eremomycini* and *Streptoallelefeichus cremeus* subsp. *tobramycini*. Abstr 7th Int. Congress «Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development». М.: 2013; 1: 74.

Динамика структуры возбудителей бактериемии и сепсиса у реанимационных больных в многопрофильном стационаре скорой помощи

Т. В. ЧЕРНЕНЬКАЯ, Л. А. БОРИСОВА, И. В. АЛЕКСАНДРОВА, С. И. РЕЙ, О. В. НИКИТИНА, Д. А. КОСОЛАПОВ

НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва

Pattern Dynamics of Bacteremia and Sepsis Pathogens in ICU Patients of Emergency Service

T. V. CHERNENKAYA, L. A. BORISOVA, I. V. ALEKSANDROVA, S. I. REI, O. V. NIKITINA, D. A. KOSOLAPOV

N. V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Service, Moscow

Проанализированы результаты микробиологического исследования 2382 проб крови от 698 больных, находившихся на лечении в 3 реанимационных отделениях НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского в 2009—2012 гг. Роста микроорганизмов не обнаружено в 1160 (48,7%) пробах. Для дальнейшего анализа отобрано 816 штаммов микроорганизмов. За период с 2009 по 2012 гг. в общей структуре возбудителей доля грамположительных микроорганизмов уменьшилась с 51,68 до 35,9%, грамотрицательных увеличилась с 38,26 до 48,1%. Высеваемость грибов рода *Candida* увеличилась с 7,38 до 15,2%. Уменьшилась частота выделения *S.aureus* с 26,2 до 13,3%, *Enterococcus* spp. с 15,4 % до 11,5%. Увеличилась доля *K.pneumoniae* с 8,1 до 18,9%, *Acinetobacter* spp. с 14,1 до 17,4%. Большинство штаммов *S.aureus* были метициллинорезистентные. Все штаммы стафилококков были чувствительны к ванкомицину и линезолиду. Все штаммы *K.pneumoniae*, выделенные в 2009—2012 годах, являлись продуцентами β -лактамаз расширенного спектра действия. В 2012 году 7,8% штаммов *K.pneumoniae* были устойчивыми к карбапенемам. В 2012 году 25,5% штаммов *Acinetobacter* spp. были чувствительными к карбапенемам; 70,2% — к цефоперазону/сульбактаму.

Ключевые слова: ОРИТ, бактериемия, возбудители, антибиотикорезистентность.

The results of microbiological tests of 2382 blood specimens from 698 patients of three ICUs of the N. V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Service were analysed for a period of 2009 to 2012. No microbial growth was detected in 1160 specimens (48.7%). In the subsequent tests 816 isolates were used. The quota of grampositive isolates in the pathogen pattern decreased from 51.68 to 35.9% and that of gramnegative isolates increased from 38.26 to 48.1%. The number of the *Candida* isolates increased from 7.38 to 15.2%. The frequency of the *S.aureus* and *Enterococcus* spp. isolates lowered from 26.2 to 13.3% and from 15.4 to 11.5% respectively. The quota of *K.pneumoniae* isolates and *Acinetobacter* spp. increased from 8.1 to 18.9% and from 14.1 to 17.4% respectively. Most of the *S.aureus* isolates were methicillin resistant. All the staphylococcal isolates were susceptible to vancomycin and linezolid. All the strains of *K.pneumoniae* isolated in 2009—2012 produced extended spectrum beta-lactamases. In 2012 7.8% the *K.pneumoniae* isolates were resistant to carbapenems. In 2012 25.5% of the *Acinetobacter* spp. isolates were susceptible to carbapenems and 70.2% were susceptible to cefoperazone/sulbactam.

Key words: ICU, bacteremia, pathogens, antibiotic resistance.

В современной клинической практике увеличивается количество пациентов пожилого и старческого возраста, больных с тяжёлой сопутствующей патологией, сниженным иммунитетом. Внедрение новых диагностических и лечебных технологий позволяет спасать жизни пациентам во многих критических состояниях, ранее считавшихся несовместимыми с жизнью. Однако увеличение доли пациентов, находящихся в критическом состоянии, значительно повышает риск развития у них инфекционных осложнений и сепсиса. Так, в США за пе-

риод с 2000 по 2008 гг. более чем в два раза увеличилось количество пациентов, госпитализированных с бактериемией и сепсисом [1]. Ежегодно в мире регистрируется более 18 млн случаев тяжёлого сепсиса и прогнозируется дальнейшее увеличение заболеваемости примерно на 1,5% в год [2].

Несмотря на активную разработку и внедрение в практику новых методов лечения, тяжёлый сепсис остается одной из основных причин смертности пациентов реанимационных отделений (ОРИТ), которая достигает 30—45% [2, 3]. Прямые затраты на лечение одного пациента в ОРИТ с развившимся сепсисом в 10 раз выше, чем средняя стоимость терапии других реанимационных пациентов [3].

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 129010, г. Москва, Сухаревская площадь, д. 3. НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского

Таблица 1. Количество исследованных проб крови от реанимационных больных в 2009—2012 гг.

Показатель	2009 г.	2010 г.	2011 г.	2012 г.	Всего
Количество больных	140	162	183	213	698
Количество проб крови	474	594	488	826	2382
Из них без роста микроорганизмов, %	52,1	47,8	45,9	49,2	48,7

С каждым годом все более значимой становится проблема распространения микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью. Резистентность возбудителей к антибиотикам значительно осложняет выбор эмпирической противомикробной терапии, являющейся одной из ключевых при лечении больных с сепсисом.

Цель настоящей работы — изучить изменение этиологической структуры возбудителей сепсиса и их чувствительности к антибиотикам у больных реанимационного профиля за 4 года.

Материал и методы

Проведён анализ результатов микробиологического исследования 2382 проб крови от 698 больных, находившихся на лечении в трёх реанимационных отделениях НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского в 2009—2012 гг. В реанимации острых эндотоксикозов (РОЭ) проходили лечение 205 пациентов, в послеоперационной хирургической реанимации (ПОХР) — 197, общей реанимации — 296 больных. В РОЭ помощь оказывалась пациентам с полиорганной недостаточностью, развившейся вследствие тяжёлого панкреонекроза, цирроза печени, деструкции мягких тканей. В ПОХР проводилось лечение больных с медиастинитами, распространёнными перитонитами, открытой травмой груди и живота и с неотложной сосудистой патологией. В общей реанимации находились пострадавшие с тяжёлой сочетанной травмой.

У всех пациентов, включённых в данное исследование, были признаки синдрома системной воспалительной реакции (SIRS), который был связан с присутствием микробов и/или их токсинов в крови и характеризовался наличием двух и более из следующих симптомов:

- температура тела более 38°C или менее 36°C;
- лейкоцитоз ($> 10 \cdot 10^9/\text{л}$) или лейкопения ($< 4 \cdot 10^9/\text{л}$) или количество палочкоядерных нейтрофилов более 10%;
- число сердечных сокращений более 90 ударов в минуту;
- число дыханий более 24 в 1 минуту.

В данную работу были включены результаты микробиологического исследования крови пациентов, у которых за время пребывания в реанимации проведено 2 и более посевов крови. От одного пациента исследовали от 2 до 18 проб крови (в среднем — 3,4).

Забор крови у пациентов проводили из периферической вены с соблюдением правил асептики. Для одного исследования одномоментно отбирали по 10 мл крови в два флакона:

- для аэробных бактерий — Bactec™ Plus Aerobic/F Culture Vials;
- для анаэробных микроорганизмов — Bactec™ Plus Anaerobic/F Culture Vials.

По показаниям, в случае подозрения на грибковый сепсис, одновременно с аэробными и анаэробными флаконами дополнительно производили отбор 10 мл крови во флакон Bactec™ Mycosis IC/F Culture Vials. Полученные образцы доставляли в лабораторию и помещали в анализатор гемокультур Bactec 9050. Стандартный протокол культивирования флаконов в приборе — 5 суток для аэробных и анаэробных флаконов и 14 — для грибных. При отсутствии роста бактерий в течение 5 суток (для грибных флаконов — 14) выдавали отрицательный результат исследования.

При выявлении роста микроорганизмов проводили микроскопию мазка из содержимого флакона, окрашенного по Граму. Затем содержимое флакона высевали на плотные питательные среды (агар Шадлера, 5% кровяной агар, маннит-солевой агар, среды Эндо и Сабуро). Идентификацию микроорганизмов и определение их чувствительности к антибиотикам проводили с использованием автоматического микробиологического анализатора WalkAway 40 (Siemens).

Подтверждение образования энтеробактериями бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС) проводили с помощью метода «двойных дисков» [4].

Однократное обнаружение коагулазонегативного стафилококка трактовали как контаминацию пробы крови при отборе [5].

В случае выделения от больного в нескольких последовательных пробах крови одного и того же вида микроорганизма для последующего анализа учитывали только первый результат.

При длительном нахождении пациента в отделении реанимации в ряде случаев происходила смена возбудителя. Для анализа учитывались все этиологически значимые патогены.

Нулевую гипотезу об отсутствии различий между набором возбудителей в разные годы проверяли с использованием критерия χ^2 .

Результаты исследований

При исследовании 2382 проб крови роста микроорганизмов не обнаружено в 1160 пробах (48,7%). За период с 2009 по 2012 гг. количество проб крови без роста колебалось от 45,9 до 52,1% (табл. 1).

После исключения повторных высевов одного и того же возбудителя от одного пациента, для дальнейшего анализа было отобрано 816 штаммов микроорганизмов, выделенных в 2009—2012 гг. (табл. 2).

В 2009 г. грамположительные возбудители высевались в 51,68% случаев, грамотрицательные — в 38,26%, грибы рода *Candida* — в 7,38% и анаэробные микроорганизмы — в 2,68% случаев. Из грамположительных бактерий чаще всего выделялся золотистый стафилококк (26,2%). Энтерококки встречались в 15,4% случаев. Среди грамотрицательных патогенов преобладали представители неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОВ) — 23,5%. Энтеробактерии обнаружены в 14,8% случаев. Ведущими грамотрицательными возбудителями были *Acinetobacter* spp. (14,1%) и *K.pneumoniae* (8,1%).

При анализе структуры возбудителей, выделенных из крови больных реанимационного профиля, за 4 года выявлены изменения в частоте высеваемости основных патогенов. Так, за период с 2009 по 2012 год в общей структуре возбудителей доля грамположительных микроорганизмов уменьшилась с 51,68 до 35,9%, а доля грамотрицательных увеличилась с 38,26 до

Таблица 2. Структура возбудителей, выделенных из крови реанимационных больных в 2009—2012 гг. (%)

Микроорганизмы	2009 г.	2010 г.	2011 г.	2012 г.
Грамотрицательные бактерии	38,26	46,9	48,8	48,1
<i>Escherichia coli</i>	2,68	3,6	4,4	3,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8,05*	9,8	14,8	18,9*
Enterobacteriaceae	4,03	7,7	7,9	4,1
<i>Acinetobacter</i> spp.	14,09*	14,4	14,8	17,4*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,70	4,6	3,0	2,2
<i>Burkholderia cepacia</i>	1,34	3,1	3,0	1,9
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	1,0	1,0	0,7
Другие НГОБ	3,36	3,1	0	0
Грамположительные бактерии	51,68	40,2	37,4	35,9
<i>S. aureus</i>	26,17*	21,1	17,2	13,3*
<i>Staphylococcus</i> spp.	7,38	2,6	5,4	10,0
<i>Streptococcus</i> spp.	2,68	2,9	2,5	1,1
<i>Enterococcus</i> spp.	15,44*	14,4	12,3	11,5*
Условно-патогенные грибы	2,68	3,1	1,0	0,7
<i>Candida</i> spp.	7,38*	9,8	12,8	15,2*
Всего штаммов	149	194	203	270

Примечание. * — различия между частотой высеваемости в 2009 г. и 2012 г. статистически достоверны, $p < 0,00001$.

48,1%. В два раза увеличилась высеваемость грибов рода *Candida* (с 7,38 до 15,2%). Отмечены достоверные различия ($p < 0,00001$) в частоте высеваемости следующих микроорганизмов:

- уменьшилась частота выделения *S. aureus* (с 26,2 до 13,3%),
- уменьшилась частота высеваемости *Enterococcus* spp. (с 15,4 до 11,5%),
- увеличилась доля *K. pneumoniae* (с 8,1 до 18,9%),
- увеличилась частота высеваемости *Acinetobacter* spp. (с 14,1 до 17,4%).

Различия в частоте обнаружения других патогенов были статистически не достоверны.

В 2012 г. проводилась видовая идентификация грибов рода *Candida*. Из 41 штамма грибов, выделенных из крови больных ОРИТ, 75,6% принадлежали к виду *Candida albicans*. Другие виды встречались значительно реже: *C. parapsilosis* — 14,3% (6 штаммов), *C. glabrata* — 7,3% (3 штамма), *C. krusei* — 2,4% (1 штамм).

На рис. 1 представлена чувствительность к антибиотикам *S. aureus*, выделенных из крови больных ОРИТ. Большинство штаммов *S. aureus*, выделенных в 2009 и 2012 гг., были метициллинорезистентные (MRSA) — 93,2 и 92,8% соответственно. Устойчивые к оксацилину штаммы трактовались как резистентные ко всем бета-лактамам антибиотикам. Все штаммы стафилококков были чувствительны к ванкомицину и линезолиду.

На рис. 2 и 3 представлена чувствительность к антибиотикам *K. pneumoniae* и *Acinetobacter* spp.

Все штаммы *K. pneumoniae*, выделенные в 2009—2012 гг. из крови реанимационных больных, являлись продуцентами β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и трактовались как устойчивые ко всем цефалоспорином III генерации (ЦС III). Количество штаммов, чувствительных к

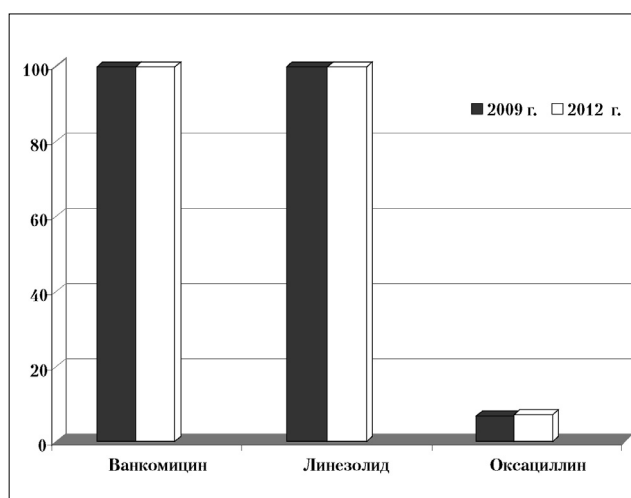


Рис. 1. Чувствительность к антибиотикам штаммов *S. aureus*, выделенных из крови реанимационных больных в 2009 и 2012 гг. (% чувствительных штаммов).

амикацину в 2009—2012 гг. составляло около 25%, к ципрофлоксацину — не превышало 20%. В 2009 г. все выделенные штаммы *K. pneumoniae* были чувствительны к карбапенемам (меропенему). Обращает на себя внимание, что в 2012 году из 51 штамма *K. pneumoniae*, выделенных из крови больных реанимационного профиля, 4 (7,8%) были устойчивыми к карбапенемам.

Большинство штаммов *Acinetobacter* spp. являлись полирезистентными. В 2009 и 2012 гг. чувствительными к амикацину были только 9,5 и 6,7%, а к ципрофлоксацину — 9,5 и 4,2% штаммов соответственно. Менее половины штаммов *Acinetobacter* spp., выделенных из крови больных ОРИТ, были чувствительными к карбапенемам. Так, в 2009 году к меропенему были чувствительны 38,1%, а в 2012 году — только 25,5% штаммов *Acinetobacter* spp. Хорошая чувствительность

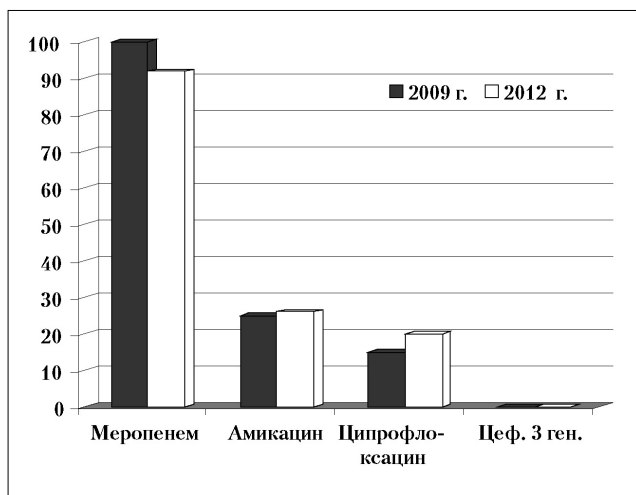


Рис. 2. Чувствительность к антибиотикам штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из крови реанимационных больных в 2009 и 2012 гг. (% чувствительных штаммов).

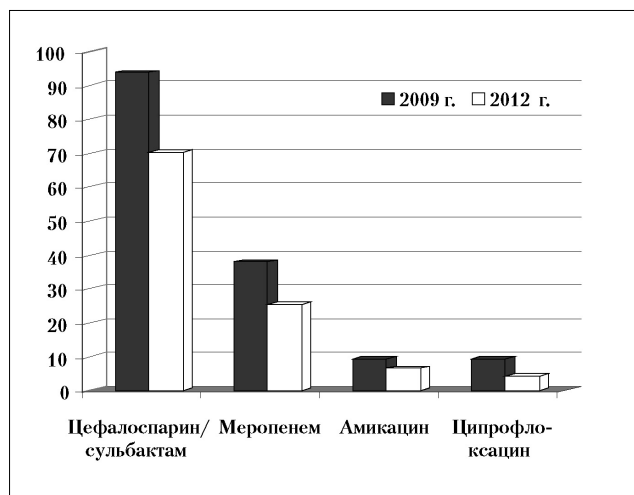


Рис. 3. Чувствительность к антибиотикам *Acinetobacter* spp., выделенных из крови реанимационных больных в 2009 и 2012 гг. (% чувствительных штаммов).

Acinetobacter spp. в 2009 году отмечалась к цефоперазону/сульбактаму — 19 из 21 штамма (90,5%). В 2012 г. чувствительными к цефоперазону/сульбактаму были 33 из 47 штаммов (70,2%).

Обсуждение результатов

По данным различных авторов, высеваемость микроорганизмов из крови пациентов реанимационных отделений составляет 12,6—16,7% [6, 7]. В нашем исследовании около половины исследованных проб крови были с ростом микроорганизмов. Вероятно, это связано с тем, что в нашем стационаре микробиологические исследования проводятся только у наиболее тяжёлых пациентов.

Данные о структуре возбудителей сепсиса у больных реанимационного профиля противоречивы. По результатам ряда исследований грамположительные микроорганизмы остаются наиболее частой причиной сепсиса [7—9]. Другие авторы указывают на ведущую роль грамотрицательных патогенов [6, 10, 11]. Различия в частоте встречаемости патогенов связаны с особенностями контингентов обследованных больных и могут зависеть от географических особенностей, локализации первичного очага инфекции и возраста пациентов.

По данным нашего исследования, за период с 2009 по 2012 годы произошло уменьшение доли грамположительных микроорганизмов в структуре возбудителей сепсиса с 51,68 до 35,9%. При этом почти на 10% увеличилась доля грамотрицательных патогенов (с 38,26 до 48,1%) и в два раза возросла высеваемость грибов рода *Candida* (с 7,38 до 15,2%).

В последние годы многие исследователи отмечают увеличение числа случаев грибкового сепсиса [7—9, 11, 12]. Внедрение новых инвазив-

ных диагностических и лечебных технологий, использование цитостатической и иммуносупрессивной терапии, активное применение антибактериальных препаратов широкого спектра действия приводят к значительному возрастанию риска развития кандидемии у пациентов ОРИТ. Основными возбудителями кандидемии являются *Candida albicans* (15—60%), *C. parapsilosis* (5—40%), *C. glabrata* (5—25%), *C. tropicalis* (5—15%), *C. krusei* (3—7%) [12]. По данным нашего исследования, в 2012 году три четверти полученных из крови грибов идентифицированы как *C. albicans*. Выделены единичные штаммы *C. parapsilosis*, *C. glabrata* и *C. krusei*, а *C. tropicalis* у изученного контингента пациентов не обнаружили.

Стойкая тенденция к увеличению числа случаев грибкового сепсиса у пациентов реанимационного профиля представляет серьёзную клиническую проблему, так как при возникновении кандидемии вероятность летального исхода во время госпитализации увеличивается в два раза, продолжительность лечения — на 3—30 дней, стоимость лечения — в 1,5—5 раз [12].

Кроме изменения общего соотношения грамотрицательных, грамположительных патогенов и грибов, в последние годы отмечаются различия в частоте высеваемости из крови отдельных видов микроорганизмов. Так, некоторые авторы указывают на увеличение доли *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp. в структуре возбудителей сепсиса [7, 10].

По нашим данным, за последние 4 года наметилась тенденция к снижению частоты высеваемости *P. aeruginosa* (с 4,7% в 2009 г. до 2,2% в 2012 г.). Доля *Acinetobacter* spp. в структуре возбудителей сепсиса достоверно увеличилась за этот период времени и составила в 2012 г. 17,4%. Более

чем в два раза за изученный период времени возросла высеваемость *K.pneumoniae* (с 8,1 до 18,9%).

Кроме изменения видового состава патогенов, в последние годы обращает на себя внимание нарастание резистентности к антибиотикам среди возбудителей сепсиса. Во многих европейских странах доля полирезистентных микроорганизмов, выделенных из крови пациентов с сепсисом, превышает 25% [13]. Появление и быстрое распространение в ОРИТ микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью часто связывают с чрезмерным использованием антибиотиков широкого спектра действия. Назначение препаратов с избыточной противомикробной активностью способствует селекции полирезистентных штаммов бактерий и может вести к изменениям в общей структуре возбудителей внутрибольничных инфекций [14].

Возникновение устойчивости микроорганизмов является естественным биологическим ответом на использование антибиотиков. В связи с тем что антибиотики — незаменимый класс препаратов и их применение в современной медицине необходимо, появление устойчивых микроорганизмов является нежелательным явлением антибактериальной терапии.

С начала 1990-х годов отмечается широкое распространение в стационарах всего мира штаммов MRSA. Доля таких штаммов в некоторых учреждениях превышает 60% [7, 13]. По нашим данным, более 90% штаммов *S.aureus*, выделенных из крови больных ОРИТ за период с 2009 по 2012 гг., были MRSA. Вместе с тем в последние годы появились сообщения о снижении заболеваемости инвазивными MRSA инфекциями [13, 15], что связывают с активным внедрением образовательных программ для медицинских работников и более строгим соблюдением принципов инфекционного контроля в стационарах.

15—20 лет назад *Acinetobacter* spp. относили к оппортунистическим патогенам. В последние годы *Acinetobacter* spp. все чаще встречается среди возбудителей внутрибольничных инфекций, особенно в ОРИТ. Препаратами выбора для лечения инфекций, вызванных этим микроорганизмом, являются карбапенемы. Однако в настоящее время в разных странах мира выделяются штаммы, устойчивые к карбапенемам и другим противомикробным препаратам. По данным D. W. Wareham и соавт. [16], за 8 лет доля устойчивых к карбапенемам штаммов *Acinetobacter* spp. увеличилась с 0 до 55%. Факторами риска бактериемии, вызванной множественноустойчивыми штаммами *Acinetobacter* spp., являются наличие у пациентов инфекции респираторного тракта, длительная ИВЛ, наличие внутрисосудистых катетеров, предшествующая бактериемия, вызванная другими возбудителя-

ми [17]. Среди пациентов ОРИТ увеличивается количество больных пожилого и старческого возраста, с тяжёлой сопутствующей патологией, сниженным иммунитетом, массивной кровопотерей. Увеличение доли таких пациентов значительно повышает риск развития инфекционных осложнений и сепсиса, вызванных полирезистентными штаммами *Acinetobacter* spp.

Первые БЛРС-продуцирующие штаммы энтеробактерий были выделены во Франции, а затем описаны вспышки внутрибольничных инфекций в стационарах США в 1980-е годы [18]. В настоящее время такие штаммы широко распространены во всем мире и часто характеризуются множественной лекарственной устойчивостью. После внедрения в клиническую практику карбапенемов эти препараты рассматривались как универсальное средство лечения инфекций, вызванных полирезистентными грамотрицательными микроорганизмами. Однако через 15 лет после начала активного применения карбапенемов появились устойчивые к ним штаммы энтеробактерий. По данным многих авторов, в последние годы число штаммов карбапенемоустойчивых *K.pneumoniae* возрастает в геометрической прогрессии и может достигать в отдельных ОРИТ 40—50% [7, 13, 18].

В нашем исследовании все штаммы *K.pneumoniae*, выделенные из крови реанимационных больных, продуцировали БЛРС. За период с 2009 по 2012 гг. устойчивость *K.pneumoniae* к карбапенемам увеличилась с 0 до 7,8% и в два раза увеличилась доля *K.pneumoniae* в структуре возбудителей сепсиса. Увеличение числа случаев сепсиса, вызванного *K.pneumoniae*, может быть, как раз связано с появлением госпитальных штаммов, устойчивых к карбапенемам. В случае развития инфекции, вызванной подобными возбудителями, проводимая антибактериальная терапия доступными препаратами оказывается неэффективной. Эксперты придают особое значение проблеме карбапенемоустойчивых возбудителей в связи с отсутствием альтернативных для лечения антибиотиков [18, 19].

Заключение

Таким образом, полученные нами результаты показывают изменение структуры возбудителей сепсиса у реанимационных больных за 4 года (2009—2012 гг.), увеличение числа случаев кандидемий и бактериемий, вызванных полирезистентными микроорганизмами.

Активное использование инвазивных диагностических и лечебных процедур, увеличение количества пациентов, находящихся в критическом состоянии, применение антибиотиков с широким, часто избыточным, спектром действия повышают вероятность колонизации, а затем и ин-

фицирования больных полирезистентными госпитальными штаммами микроорганизмов.

Учитывая имеющийся в некоторых клиниках положительный опыт снижения числа случаев тяжёлых инфекций, вызванных полирезистент-

ными возбудителями, необходимо жёсткое соблюдение принципов инфекционного контроля, повышение качества микробиологической диагностики и совершенствование политики применения антибиотиков в стационаре.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hall M.J., Williams S.N., DeFrances C.J. et al. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals [Электронный ресурс]. Режим доступа: www.cdc.gov/nchs/data/databriefs/db62.pdf
2. Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001; 29: 7: 1303–1310.
3. Sogayar A.M., Machado F.R., Rea-Neto A. et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian Intensive Care Units. *Pharmacoeconomics.* 2008; 26: 5: 425–434.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. — 8th ed. — Wayne, PA: NCCLS, 2003; M02—A8.
5. Tokars J. Predictive value of blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: implications for patient care and health care quality assurance. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 3: 334–341.
6. Hashairi F., Hasan H., Azlan K. et al. An eight-year review of blood culture and susceptibility among sepsis cases in emergency department in North-Eastern Malaysia. *Trop Biomed* 2011; 28: 3: 599–605.
7. Orsini J., Mainardi C., Muzylo E. et al. Microbiological profile of organisms causing bloodstream infection in critically ill patients. *J Clin Med Res* 2012; 4: 6: 371–377.
8. Martin G.S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10: 6: 701–706.
9. Mitt P., Adamson V., Loivukene K. et al. Epidemiology of nosocomial bloodstream infections in Estonia. *J Hosp Infect* 2009; 71: 4: 365–370.
10. Chen Y.H., Hsueh P.R. Changing bacteriology of abdominal and surgical sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 2012; 25: 5: 590–595.
11. Клясова Г.А., Сперанская Л.Л., Миронова А.В. и др. Возбудители сепсиса у иммунокомпрометированных больных: структура и проблемы антибиотикорезистентности (результаты многоцентрового исследования). *Гематол трансфузиол* 2007; 52: 1: 11–18.
12. Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Российские национальные рекомендации. М.: 2010; 87.
13. Hajdu A., Kurcz A., Böröcz K. Hospital-acquired infections due to multidrug-resistant organisms in Hungary, 2005–2010 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20352>
14. Levy S.B. Antimicrobial resistance: bacteria on the defence. Resistance stems from misguided efforts to try to sterilise our environment. *BMJ* 1998; 317: 7159: 612–613.
15. Kallen A.J., Mu Y., Bulens S. et al. Health care-associated invasive MRSA infections, 2005–2008. *JAMA* 2010; 304: 6: 641–648.
16. Wareham D.W., Bean D.C., Khanna P. et al. Bloodstream infection due to *Acinetobacter* spp: epidemiology, risk factors and impact of multi-drug resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 7: 607–612.
17. Jung J.Y., Park M.S., Kim S.E. et al. Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the Intensive Care Unit. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 228.
18. Grundmann H., Livermore D.M., Giske C.G. et al. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19711>.
19. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.cdc.gov/MMWR/preview/mmwrhtml/mm5810a4.htm>

Иммуотропные свойства анаферона и анаферона детского

Е. С. ЖАВБЕРТ, Ю. Л. ДУГИНА, О. И. ЭПШТЕЙН

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственная Фирма «Материя Медика Холдинг», Москва

Immunotropic Properties of Anaferon and Anaferon Pediatric

E. S. ZHAVBERT, YU. L. DUGINA, O. I. EPSTEIN

Materia Medica Holding, Ltd, Moscow

Препараты анаферон и анаферон детский, созданные на основе релиз-активных антител к интерферону-гамма (Р-А антител к ИФН-гамма), эффективны в лечении целого ряда вирусных инфекций. В серии доклинических исследований, проведённых в ведущих российских и зарубежных научных организациях, были выявлены иммуномодулирующие (иммуотропные) свойства препаратов, обзор которых представлен в настоящей статье. Анаферон и анаферон детский стимулируют гуморальный и клеточный иммунный ответ, повышают фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов. Ключевым механизмом иммуотропного действия Р-А антител к ИФН-гамма является влияние на систему интерферонов, в частности на ИФН-гамма, и функционально сопряжённых с ней цитокинов, приводящее к нормализации функциональной активности естественных факторов иммунной защиты и к усилению противовирусного действия. Благодаря широкому спектру иммуотропной активности препараты анаферон и анаферон детский более 10 лет успешно применяются в лечении и профилактике заболеваний, в основе которых лежат нарушения функционального состояния иммунной системы.

Ключевые слова: анаферон, анаферон детский, релиз-активные антитела к ИФН-гамма, иммуотропная активность, иммуномодулятор, противовирусный препарат.

Anaferon and pediatric anaferon based on release-active antibodies to interferon- γ (R-A antibodies to INF- γ) proved to be efficient in the treatment of many viral infections. Immunomodulating (immunotropic) properties of the drugs were revealed in the preclinical studies at many Russian and foreign research medical institutions and are reviewed herein. Anaferon and pediatric anaferon stimulated the humoral and cellular immune responses and increased the neutrophil and macrophage activity. The crucial mechanism of the immunotropic action of R-A antibodies to INF- γ was the effect on the system of interferons and in particular on INF- γ and functionally conjugated cytokines, resulting in normalization of the functional activity of the innate factors of the immune defense and increasing of the antiviral action. The broad spectrum of the immunotropic activity provided the success of anaferon and anaferon pediatric for more than 10 years in the treatment and prophylaxis of the diseases associated with disorders in the immune system functional state.

Key words: anaferon, pediatric anaferon, release-active antibodies to INF- γ , immunotropic activity, immunomodulators, antivirals.

Введение

Среди современных препаратов, применяемых для лечения вирусных инфекций, в особую группу выделяют препараты, которые в дополнение к противовирусной активности обладают иммуотропными свойствами. Иммуотропные лекарственные средства (иммуномодуляторы) — это препараты, регулирующие и восстанавливающие деятельность иммунной системы. Иммунная система человека выполняет важную функцию по сохранению постоянства внутренней среды организма, распознавая и удаляя из организма чужеродные антигены как эндогенной (клетки, измененные вирусами, ксенобиотиками, злокачественные клетки и т. д.), так и экзо-

генной природы (вирусы, бактерии, грибы, ксенобиотики). В осуществлении данной функции участвуют факторы врождённого (нейтрофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, естественные киллеры) и приобретённого (адаптивного) иммунитета (Т- и В-клетки) [1]. Интерфероны — естественные цитокины, обладающие универсальными антивирусными свойствами — способностью к подавлению репликации многих РНК- и ДНК-содержащих вирусов за счёт ингибирования процессов транскрипции и трансляции вирусных матриц [2]. Помимо противовирусного действия, интерфероны (ИФН) влияют на клеточный и гуморальный иммунитет, пролиферацию и дифференцировку клеток, продукцию и активность различных цитокинов, внутриклеточных ферментов (аденилатциклазы, фосфодиэстеразы), онкогенез, апоптоз, нейроэндокринные и обменные процессы, происходя-

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции:

E-mail: zhavbertes@materiamedica.ru

шие в клетках. В настоящее время выделяют 3 основных свойства системы интерферонов: антимикробное действие, иммуномодулирующую активность, антипролиферативные эффекты. Особый интерес для лечения многих заболеваний, в том числе вирусной природы, представляют препараты, способные оказывать иммуномодулирующее действие, заключающееся в разнонаправленном действии на иммунную систему в зависимости от её исходного состояния и способные восстанавливать нормальное функционирование иммунной системы (обеспечивать эффективную иммунную защиту).

В 2001 году на основе релиз-активных (Р-А) антител к ИФН-гамма специалистами компании ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг» были разработаны препараты, влияющие на систему интерферонов: анаферон детский (РУ РN000372/01 от 31.05.2007, разрешён к применению у больных с 1 месяца) и анаферон (РУ РN003362/01 от 06.11.2009, разрешён к применению у больных с 18 лет). Р-А антитела к ИФН-гамма также являются компонентом нового эффективного противовирусного препарата эргоферон, зарегистрированного в 2010 году (РУ ЛСР-007362/10 от 29.07.2010).

Используемая в производстве препаратов субстанция антител к ИФН-гамма, аффинно очищенных, произведена в Великобритании в компании Angel Biotechnology Inc в полном соответствии с международными требованиями надлежащей производственной практики (GMP). Как и другие препараты релиз-активных (Р-А) антител, Р-А антитела к ИФН-гамма оказывают специфическое модифицирующее действие на антиген, к которому они выработаны. С помощью метода ядерно-магнитного резонанса было показано, что Р-А антитела к ИФН-гамма вызывают конформационные изменения в молекуле ИФН-гамма. В подтверждение данного феномена, в радиолигандных исследованиях *in vitro* было выявлено, что Р-А антитела к ИФН-гамма усиливают взаимодействие ИФН-гамма с его рецептором (количество ИФН-гамма связавшегося с рецептором). Кроме того, Р-А антитела к ИФН-гамма изменяют аффинность связывания ИФН-гамма с антителами к ИФН-гамма, что было обнаружено с использованием иммуносенсорного метода и метода иммуноферментного анализа [3, 4].

Целью настоящего обзора явился анализ данных экспериментальных исследований, посвященных изучению иммуотропных свойств Р-А антител к ИФН-гамма (препараты анаферон и анаферон детский).

По заказу ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг» было проведено 76 доклинических исследований фармакологической активности и безопасности препаратов Р-А антител к ИФН-гамма:

56 исследований в ведущих научных учреждениях России, в том числе в НИИ фармакологии СО РАМН, Волгоградском медицинском университете, ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», НИИ гриппа РАМН и др., и 20 исследований в зарубежных научных институтах и контрактных организациях, в том числе в компании Arcis SA, Франция, университете Питтсбурга, США, компании Euroscreen, Бельгия, в государственном университете штата Юта, США, компании Сегер, Франция и др. В настоящее время идут и запланированы ряд новых исследований с целью углублённого изучения механизмов действия и эффектов препаратов.

Анаферон и анаферон детский давно и успешно используются в клинической практике для профилактики и лечения острых и хронических вирусных инфекций: гриппа, острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), герпесвирусных инфекций и др. В доклинических исследованиях была доказана противовирусная эффективность Р-А антител к ИФН-гамма как при профилактическом, так и при лечебном применении в условиях экспериментального заражения животных РНК- (вирусы гриппа А/Н3N2, А/Н3N8, «птичий грипп» А/Н5N1, несколько штаммов пандемического «свиного» гриппа А/Н1N1) и ДНК- (вирус простого герпеса II типа, штаммы MS и ЕС) содержащими вирусами [5–7]. Клиническая эффективность и безопасность анаферона и анаферона детского была изучена при следующих инфекциях: грипп (вирусы гриппа А, В), ОРВИ (вызванные аденовирусом, респираторно-синцитиальным вирусом, коронавирусом, вирусом парагриппа, микоплазмой, а также микстинфекцией); герпесвирусные инфекции (ветряная оспа, инфекционный мононуклеоз, генитальный герпес); острые кишечные инфекции вирусной этиологии (вызванные калицивирусом, коронавирусом, ротавирусом) и др. [8–14].

Ключевым механизмом действия Р-А антител к ИФН-гамма является влияние на функциональное состояние системы интерферонов, в том числе через систему естественных аутоантител к ИФН-гамма [15]. Влияние на систему интерферонов является триггерным механизмом, через который анаферон/анаферон детский вовлекают в реализацию своей фармакологической активности естественные факторы врождённого и приобретённого иммунитета (клеточный и гуморальный иммунитет, фагоцитарная активность нейтрофилов и макрофагов). В клинических исследованиях подтверждено наличие у препаратов Р-А антител к ИФН-гамма противовирусной и иммуотропной активности. Иммуотропные свойства препарата были отмечены при различных патологиях (ОРВИ, грипп, мононуклеоз, калицивирусная, коронавирусная, ротавирусная

инфекция) как при профилактическом, так и при лечебном введении [15–19].

Способность препарата увеличивать количество ИФН-гамма, связывающегося со своим рецептором, позволяет сделать предположение, что Р-А антитела к ИФН-гамма увеличивают количество функционально активных рецепторов на клеточной мембране и, возможно, являются аллостерическим модулятором рецептора ИФН-гамма. Выявленный эффект нашёл подтверждение и в клинических исследованиях препарата — анаферон детский увеличивал субпопуляцию лимфоцитов, экспрессирующих на клеточной мембране рецепторы к ИФН-гамма (CD119+ -лимфоциты) [20].

В экспериментальных исследованиях *ex vivo* было показано, что Р-А антитела к ИФН-гамма стимулируют продукцию ИФН-гамма. Важно отметить, что использование Р-А антител к ИФН-гамма не приводит к гиперпродукции ИФН-гамма. Так в условиях экспериментальной модели меланомы В-16 было показано отсутствие усиления роста и метастазирования на фоне курсового введения Р-А антител к ИФН-гамма крысам, что позволило сделать вывод об отсутствии гиперпродукции ИФН-гамма, так как известно, что данный цитокин приводит к увеличению метастазирования в лёгкие и резистентности клеток меланомы к терапии [21].

Материал и методы

Эксперименты проведены на 246 мышах (180 самцах и 66 самках) линии СВА, 25 мышах-гибридах F1 (СВАхС57В1/6) и 36 мышах-самцах линии С57В1/6 массой 16–18 г. Препараты Р-А антител к ИФН-гамма вводили животным в виде водного раствора внутривентриально.

При проведении опытов по оценке влияния Р-А антител к ИФН-гамма на пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов в качестве источника материала была использована периферическая кровь 10 здоровых доноров в возрасте от 22 до 36 лет.

При исследовании влияния Р-А антител к ИФН-гамма на гуморальный иммунный ответ эксперименты были проведены на мышах-самцах линии СВА (16–18 г) и мышах-самках линии С57В1/6 (16–18 г). Мышей иммунизировали минимальными дозами эритроцитов барана (ЭБ) [22] — 5×10^6 /мышь (однократно внутривентриально в объёме 0,2 мл). Для моделирования иммуносупрессии мышам однократно внутривентриально вводили циклофосфан в дозе 125 мг/кг (1/2 максимально переносимой дозы). Мышам линии СВА Р-А антитела к ИФН-гамма ($n=36$) и дистиллированную воду (контроль, $n=36$) вводили внутривентриально в дозе 0,2 мл/мышь в течение 5 дней. Исследования проводили на здоровых мышах, мышах с иммуносупрессией, иммунизированных мышах и иммунизированных мышах с иммуносупрессией. Введение ЭБ и циклофосфана осуществляли в первый день введения дистиллированной воды или Р-А антитела к ИФН-гамма. 6 мышей оставались интактными.

Мышам линии С57В1/6 (здоровым мышам и мышам с иммуносупрессией) Р-А антитела к ИФН-гамма ($n=15$) и дистиллированную воду (контроль, $n=15$) вводили внутривентриально в дозе 0,2 мл/мышь в течение 5 дней. Шесть мышей оставались интактными. На 5-е сутки после иммунизации общепринятыми методами [22, 23] определяли общее количество лейкоцитов в периферической крови (ОКЛ), весовые ин-

дексы (ИТ и ИС) и клеточность (ОКТ и ОКС) иммунокомпетентных органов (тимуса, селезёнки), а также относительное (%) и абсолютное ($\times 10^6$) количество антителообразующих клеток (АОК) в селезёнке мышей по методу А. Cunningham [24] и титр антител (АТ) в сыворотке крови с помощью стандартной реакции гемагглютинации (РГА).

Клеточный иммунный ответ изучали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на мышах-самках линии СВА (16–18 г) и мышах-самках гибридах F1 (СВАхС57В1/6) (16–18 г). Р-А антитела к ИФН-гамма ($n=9$) и дистиллированную воду (контроль, $n=9$) вводили мышам внутривентриально в дозе 0,2 мл/мышь в течение 10 дней. В конце курсового введения Р-А антитела к ИФН-гамма или дистиллированной воды проводили сенсibilизацию мышей ЭБ 1×10^7 /мышь (подкожно в объёме 0,1 мл), разрешающую дозу ЭБ (1×10^8 в объёме 20 мкл) вводили в подушечку задней лапы на 5-й день после сенсibilизации [22]. Параллельно в контралатеральную лапу вводили физиологический раствор в том же объёме. Интенсивность реакции оценивали через 24 ч по индексу реакции (ИР), который вычисляли индивидуально для каждого животного по формуле:

$$\text{ИР (\%)} = (\text{Р}_0 - \text{Р}_\text{к}) / \text{Р}_\text{к} \times 100,$$

где Р_0 — масса опытной лапы; $\text{Р}_\text{к}$ — масса контрольной лапы.

В отдельной серии экспериментов при постановке реакции ГЗТ у части опытных и контрольных животных (в каждой группе $n=6$, кроме контроля, где $n=7$) на 4-й и 5-й дни после инъекции сенсibilизирующей дозы ЭБ внутривентриально вводили специфический ингибитор NO-синтазы — NММА (NG-монометил-L-аргинин). Интенсивность реакции оценивали у каждого животного по индексу реакции.

Фагоцитарную активность Р-А антител к ИФН-гамма оценивали на мышах-самках линии СВА ($n=48$). Мышам-самкам линии СВА (16–18 г) внутривентриально в течение 10 дней вводили Р-А антитела к ИФН-гамма ($n=24$) и дистиллированную воду (контроль, $n=24$) в дозе 0,2 мл/мышь. Фагоцитарная активность нейтрофилов и макрофагов перитонеального экссудата оценивалась через 24 ч после окончания 10-дневного курса введения Р-А антител к ИФН-гамма или дистиллированной воды по способности этих клеток поглощать суточную культуру *S.aureus*, штамм 209; концентрация взвеси микробов — 100 млн/мл; учитывали процент нейтрофилов, либо макрофагов, поглотивших микробы (фагоцитарный индекс) и среднее число стафилококков, поглощённое одной клеткой (фагоцитарное число).

Пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов оценивали с помощью реакции бласттрансформации [22], основанной на способности некоторых лектинов вызывать поликлональную активацию и пролиферацию лимфоцитов, которая оценивается радиометрически по интенсивности включения в клетки ^3H -тимидина. Для активации Т-лимфоцитов использовали фитогемагглютинин (ФГА); для активации В-лимфоцитов — митоген лаконоса (МЛ). В исследовании использовали взвесь мононуклеаров периферической крови 10 здоровых доноров. Пролиферативную активность оценивали с помощью реакции индуцированной (смешивая 50 мкл мононуклеаров, 50 мкл митогена и 50 мкл Р-А антител к ИФН-гамма) и спонтанной (смешивая 50 мкл мононуклеаров, 50 мкл Р-А антител к ИФН-гамма и 50 мкл ростовой среды) бласттрансформации. В контроле вместо Р-А антител к ИФН-гамма добавляли 50 мкл ростовой среды (РС). Оценку результатов опыта определяли по индексу стимуляции (ИС):

$$\text{ИС} = \text{О} / \text{К},$$

где О — радиоактивность в лунках с митогеном; К — радиоактивность в лунках без митогена.

Те же супернатанты культур мононуклеаров использовали и для оценки активности ИЛ-1 по методу Mizel S. B. [25]. Получали 4 вида супернатанта: 1) от клеток, стимулированных липополисахаридом (ЛПС, 75 мкг/мл) — для индукции продукции ИЛ-1 в присутствии препарата (50 мкг/мл); 2) от кле-

ток, стимулированных ЛПС; 3) от клеток, культивируемых в присутствии препарата; 4) от клеток, культивируемых только в РС. Оценку результатов опыта определяли по индексу стимуляции (ИС), который рассчитывался по вышеприведённой формуле.

При оценке влияния Р-А антител к ИФН-гамма *in vitro* на функциональную активность естественных киллеров (ЕК) в качестве источника ЕК была также использована суспензия мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови здоровых доноров. Функциональную активность ЕК определяли в цитотоксической реакции по их способности лизировать клетки миелобластной линии К-562, используя радиометрический метод. Р-А антитела к ИФН-гамма в виде водного раствора добавляли в полную ростовую среду из расчёта 50 мкл на 1 мл среды.

Эксперименты по изучению влияния Р-А антител к ИФН-гамма на выработку ИФН-гамма, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 проведены на мышам-самцах линии СВА/СаЛас (18–20 г, 2–2,5 мес). Мышам-самцам линии СВА/СаЛас ежедневно в течение 10 дней внутрибрюшинно вводили Р-А антитела к ИФН-гамма ($n=48$) или дистиллированную воду (контроль, $n=48$) в дозе 0,2 мл/мышь. 6 мышей были интактными. Продукцию цитокинов определяли на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 дни введения препаратов у 6 мышей в каждой точке. Лимфоциты выделяли из взвеси селезёночных клеток мышей на градиенте Фиколла-Пака (плотность 1,077), дважды отмывали средой 199 с 5% эмбриональной телячьей сывороткой. Жизнеспособные лимфоциты опытных и контрольных групп, а также фона доводили до концентрации 2×10^6 клеток/мл и инкубировали в течение суток без (спонтанный вариант) или с добавлением 20 мкг/мл ФГА (стимулированный вариант). ИФН-гамма в культуральных супернатантах тестировали иммуноферментным (ИФА) методом.

Результаты и обсуждение

В экспериментальных исследованиях *in vivo* Р-А антитела к ИФН-гамма стимулировали гуморальный иммунный ответ. Курсовое введение препарата в течение 5 дней мышам способствовало повышению эффективности гуморального иммунного ответа на корпускулярный тимусзависимый антиген (эритроциты барана) (иммунизация минимальными дозами антигена одновременно с первым введением препарата), при этом отмечалось повышение функциональной активности антителообразующих клеток в селезёнке в 1,5 раза ($p<0,05$ vs контрольная группа) и нарастание титров гемагглютининов в сыворотке крови в 1,6 раза ($p<0,05$ vs контрольная группа). В условиях иммуносупрессии, индуцированной введением мышам циклофосфана в дозе 125 мг/кг, также отмечено усиление иммунологических реакций под действием Р-А антител к ИФН-гамма, а именно: зарегистрировано увеличение относительного содержания антителообразующих клеток в селезёнке в 1,7 раза ($p<0,05$ vs контрольная группа). Важно отметить, что стимулирующее влияние Р-А антител к ИФН-гамма было зарегистрировано в условиях минимальных доз антигена, индуцировавших весьма слабый иммунный ответ [14, 26, 27].

Курсовое введение Р-А антител к ИФН-гамма мышам в течение 10 дней повышало активность Т-эффекторов, что выражалось в усилении реакции гиперчувствительности замедленного типа, в

ответ на сенсibilизацию эритроцитами барана: индекс реакции увеличился в 1,7 раза по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$). Эффекторное звено этой реакции как в контроле, так и при введении Р-А антител к ИФН-гамма в основном реализовывалось через NO-зависимые механизмы. Как известно, основным индуктором синтеза оксида азота при иммунном ответе является ИФН-гамма. Подавление продукции NO при введении ингибитора NO синтазы NMMA *in vivo* отменяло это усиление (индекс реакции ГЗТ снизился в 3,3 раза ($p<0,05$) по сравнению с группой, в которой не вводили NMMA) [14, 26, 27].

При изучении фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов перитонеального экссудата мышей, которую оценивали через 24 часа после 10-дневного курса введения препарата, была выявлена способность Р-А антител к ИФН-гамма стимулировать фагоцитоз за счёт увеличения доли нейтрофилов и макрофагов, способных поглощать стафилококки на 37,4 и 62% по сравнению с контрольной группой соответственно ($p<0,05$). При этом количество поглощённых каждой клеткой микроорганизмов статистически значимо не менялось [26].

In vitro Р-А антитела к ИФН-гамма при добавлении в культуру мононуклеаров оказывали умеренное комитогенное действие в реакции бласттрансформации, стимулируя пролиферацию как Т-, так и В- лимфоцитов. Добавление Р-А антител к ИФН-гамма к культуре мононуклеаров совместно с Т или В митогеном способствовало повышению индекса стимуляции в 1,7 и 1,6 раза соответственно ($p>0,05$). При этом Р-А антитела к ИФН-гамма не оказывали влияния на спонтанную бласттрансформацию лимфоцитов [14].

В культуре мононуклеаров Р-А антитела к ИФН-гамма в 1,8 раза повышали выработку лимфоцитами ИЛ-1 (со стимуляцией ЛПС) и в 1,7 раза (без стимуляции ЛПС) по сравнению с контролем ($p>0,05$), а также увеличивали функциональную активность естественных киллеров, которые играют важную роль в защите организма от различных внутриклеточных микроорганизмов и опухолевых клеток, на 12,7% по сравнению с контролем ($p<0,05$) [14].

При изучении влияния Р-А антител к ИФН-гамма на продукцию ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 было показано, что препарат стимулировал преимущественно функциональную способность Т-хелперов I типа, функциональными маркерами которых являются ИФН-гамма и ИЛ-2. При стимуляции лимфоцитов фитогемагглютинином на фоне введения исследуемого препарата происходило усиление продукции как ИФН-гамма и ИЛ-2, так и ИЛ-4 и ИЛ-10, что также говорит и о стимуляции Т-хелперов II типа [14]. На фоне курсового введения Р-А антитела к ИФН-гамма достоверно по-

вышли спонтанную продукцию лимфоцитами ИФН-гамма относительно контроля на 1-е и 3—7-е сут наблюдения, с максимумом на 3-и сут введения — более чем в 8 раз по сравнению с исходным уровнем и в 6,5 раз по сравнению с контролем ($p<0,05$). Повышение ФГА-стимулированной выработки ИФН-гамма было менее выраженным, максимум приходился на 7-е сут введения, а повышение составило 9,5% относительно контроля ($p<0,05$).

На фоне введения Р-А антител к ИФН-гамма повышение спонтанной выработки ИЛ-2 лимфоцитами селезёнки мышей отмечали со 2-х по 7-е сутки. Однако статистически значимое увеличение в 1,5 раза в продукции исследуемого цитокина наблюдалось лишь на 3-е и 7-е сутки опыта ($p<0,05$). Повышение ФГА-стимулированной продукции ИЛ-2 лимфоцитами по сравнению с контролем было менее выраженным и составило 17—29% ($p<0,05$).

Повышение спонтанной выработки ИЛ-4 лимфоцитами в 3 раза и в 1,4 раза относительно контрольной группы было зарегистрировано на

7-е и 10-е сутки соответственно ($p<0,05$). Влияние введения Р-А антител к ИФН-гамма на ФГА-стимулированную продукцию ИЛ-4 было разнонаправленным в разные сроки наблюдения. Так на 1-е, 2-е и 4-е сутки это влияние было стимулирующим: отмечено увеличение продукции на 41, 38 и 19% соответственно по сравнению с группой контроля ($p<0,05$). А на 6-е и 10-е сутки ФГА-стимулированная продукция ИЛ-4 была, напротив, снижена на 17 и 26,8% относительно группы контроля соответственно ($p<0,05$).

Курсовое введение Р-А антител к ИФН-гамма не влияло на спонтанную выработку ИЛ-10 лимфоцитами селезёнки, но достоверно повышало его ФГА-стимулированную продукцию на 40,6—84,5% по сравнению с контрольной группой на 1—5-е сутки эксперимента ($p<0,05$).

Необходимо отметить, что возрастание продукции того или иного цитокина в спонтанном тесте, вероятно говорит о функциональном состоянии клеток продуцентов, в то время как в стимулированном варианте обуславливается преимущественно резервными возможностями лим-



Механизмы иммуотропного действия Р-А антител к ИФН-гамма.

фоцитов экспериментальных животных секретировать исследуемые клеточные факторы.

В клинических исследованиях была подтверждена способность препаратов на основе Р-А антител к ИФН-гамма стимулировать синтез функционально активных ИФН-гамма и ИФН-альфа, а также активировать функции и повышать функциональный резерв Т-хелперов и других иммунокомпетентных клеток (В-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, ЕК-клеток, фагоцитов и др.) [28–30].

Проведённые исследования позволяют предположить следующий механизм иммуностропного действия Р-А антител к ИФН-гамма (см. рисунок).

Выводы

В серии экспериментальных исследований иммуностропного действия было выявлено, что Р-А антитела к ИФН-гамма (препараты анаферон и анаферон детский) *in vivo* стимулируют гуморальный иммунный ответ, в том числе на фоне иммуносупрессии: повышают функциональную активность антителообразующих клеток в селезёнке; активизируют функцию Т-эффекторов, что выражается в усилении реакции гиперчувствительности замедленного типа; повышают фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов перитонеального экссудата за счёт увеличения процента активных фагоцитов. *In vitro* культуре мононуклеарных клеток Р-А антитела к ИФН-гамма стимулируют пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов; повышают функциональную активность естественных киллеров; стимулируют выработку ИЛ-1 (в присутствии липополисахарида). *Ex vivo* было обнаружено стимулирующее действие Р-А антител к ИФН-гамма на продукцию

ИФН-гамма и функционально сопряжённых цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10).

Ключевым механизмом иммуностропного действия Р-А антител к ИФН-гамма является влияние на систему интерферонов и функционально сопряжённых с ней цитокинов, приводящее к нормализации функциональной активности естественных факторов иммунной защиты (клеточный, гуморальный иммунный ответ, фагоцитарная активность нейтрофилов и макрофагов).

Фармакологической мишенью Р-А антител к ИФН-гамма является ИФН-гамма и его рецептор, а точкой приложения иммуностропной активности Р-А антител к ИФН-гамма — клетки иммунной системы, чувствительные к действию эндогенного ИФН-гамма. Р-А антитела к ИФН-гамма способны стимулировать продукцию не только самого ИФН-гамма, но и ряда функционально сопряжённых с ним цитокинов: вырабатываемых макрофагами (ИЛ-1), Т-хелперами I типа (ИЛ-2) и Т-хелперами II типа (ИЛ-4, ИЛ-10) [13, 26]. Это объясняет способность Р-А антител к ИФН-гамма стимулировать клеточный и гуморальный иммунный ответ, а также увеличивать фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов перитонеального экссудата [13, 25].

Полученные данные позволяют сделать вывод, что применение препаратов на основе Р-А антител к ИФН-гамма (препараты анаферон и анаферон детский) эффективно для лечения и профилактики развития инфекционных заболеваний, а также для коррекции дисбаланса иммунной системы у иммунокомпрометированных пациентов (в том числе у пациентов в период реконвалесценции после инфекционных заболеваний).

ЛИТЕРАТУРА

1. Афиногенова В.П., Лукачев И.В., Костинов М.П. Иммуноterapia: механизм действия и клиническое применение иммунокорригирующих препаратов. Леч. врач 2010; 4: 75–78.
2. Еришов Ф.И., Киселёв О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: «ГЭОТАР-Медиа». 2005; 368.
3. Тарасов С.А. Экспериментальная фармакология анаферона детского: спектр противовирусной активности и механизмы действия. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Томск. 2012; 22.
4. Эпштейн О.И. Феномен релиз-активности и гипотеза «пространственного» гомеостаза. Успехи физиол. наук 2013; 3: 54–76.
5. Сергеев А.Н., Пьянков О.В., Шишкина Л.Н., Дубень Л.Г., Петриченко В.А., Жуков В.А., Пьянкова О.Г., Святченко Л.И., Шерстобоев Е.Ю., Каримова Т.В., Мартюшев-Поклад А.В., Сергеева С.А., Эпштейн О.И., Готов А.Г., Глотова Т.И. Противовирусная активность сверхмалых доз антител к гамма-интерферону при пероральном введении: экспериментальное исследование гриппозной инфекции у мышей. Антибиотики и химиотер 2004; 49, 11: 7–11.
6. Шишкина Л.Н., Сергеев А.Н., Кабанов А.С., Скарнович М.О., Евтин Н.К., Мазуркова Н.А., Сергеев А.А., Белопольская М.В., Хейфец И.А., Дугина Ю.Л., Тарасов С.А., Сергеева С.А., Эпштейн О.И. Изучение эффективности лечебно-профилактического действия анаферона детского при гриппозной инфекции у мышей. Бюлл. эксперим. биол. 2008; 146, 12: 671–673.
7. Tarasov S.A., Zarubaev V.V., Gorbunov E.A. et al. Activity of ultra-low doses of antibodies to gamma-interferon against lethal influenza A (H1N1) 2009 virus infection in mice. Antiviral Res 2012; 93, 2: 219–224.
8. Савельева К.В., Учайкин В.Ф., Кладова О.В., Дриневский В.П., Осидак Л.В., Петров В.А., Бобров М.В., Егоров В.Б., Тарасов С.А., Елфимова У.В., Мартюшев-Поклад А.В., Сергеева С.А., Эпштейн О.И. Результаты клинических исследований лечебной эффективности анаферона при гриппе и других ОРВИ у детей. Мед. иммунол. 2006; 8: 2–3: 461–462.
9. Тарасов С.А., Качанова М.В., Жавберт Е.С., Дугина Ю.Л., Эпштейн О.И., Сергеева С.А. Применение сверхмалых доз антител к интерферону-γ в комплексной терапии бактериальных инфекций и профилактике бактериальных осложнений. Бюлл. эксперим. биол. мед. 2009; 148, 8. Прил.: 43–44.
10. Скрипченко Н.В., Моргацкий Н.В., Иванова Г.П., Аксенов О.А., Иванова М.В., Карасев В.В., Пульман Н.Ф., Вильниц А.А., Мурина Е.А., Горелик Е.Ю. Современные возможности экстренной неспецифической профилактики клещевого энцефалита у детей. Педиатр. фармакол. М.: 2007; 4, 7: 23–26.
11. Фомин В.В., Тункина Е.Е., Горелышева И.Ю., Лагерев Ю.Г., Сабурова Е.Б., Старопорова Е.Ю., Бацкалевич Н.А. Опыт применения ацикловира и анаферона детского при инфекционном мононуклеозе у детей. Вест. Урал. Госуд. мед. акад. 2004; 14: 54–56.
12. Кудин М.В., Федоров Ю.Н. Динамика кожного и гипертермического синдрома у детей с ветряной оспой на фоне лечения анаферона. Вopr. совр. педиатр. М.: 2006; 5, 1: 735–736.
13. Дондурей Е.А., Осидак Л.В., Головачева Е.Г., Голованова А.К., Амосова И.В., Гладченко Л.Н. Острые вирусные инфекции с сочетан-

- ным поражением респираторного и желудочно-кишечного трактов у детей. Интерферонотерапия. Бюл экспер биол мед 2009; 148, 8: 31—34.
14. *Эпштейн О.И.* Сверхмалые дозы (история одного исследования). М.: Издательство РАМН; 2008; 336.
 15. *Мартюшев-Поклад А.В.* Механизмы противовирусных и иммуномодулирующих эффектов сверхмалых доз антител к гамма-интерферону. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Томск; 2003; 22.
 16. *Дондурей Е.А., Осидак Л.В., Головачева Е.Г., Данини Г.В., Голованова А.К., Габбасова Ф.А., Николаева В.А., Минченко С.И., Сироткин А.К.* Эффективность Анаферона детского при смешанных инфекциях у детей. Дет инфекц 2006; 5, 1: 55—60.
 17. *Семенченко Л.В.* Сравнительная оценка клинико-иммунологической эффективности индукторов интерферона в реабилитации реконвалесцентов острых респираторных заболеваний. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.: 2006; 24.
 18. *Раздьяконова И.В.* Клинико-иммунологическая характеристика калицивирусной инфекции у детей и тактика терапии. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. СПб.; 2009; 20: 18.
 19. *Кондюрина Е.Г., Малахов А.Б., Ревякина В.А.* Анаферон детский. Клинические и иммуностропные эффекты в педиатрии. Фармакотер альман 2008; 1: 80—87.
 20. *Сизякина Л.П., Мельникова О.М.* Иммуномодулирующие эффекты Анаферона детского, проявляющиеся при лечении детей с рецидивирующими респираторными инфекциями. Фармакотер альман 2009; 3: 52—62.
 21. *Taniguchi K., Petersson M., Höglund P., Kiessling R., Klein G., Kärre K.* Interferon-gamma induces lung colonization by intravenously inoculated B16 melanoma cells in parallel with enhanced expression of class I major histocompatibility complex antigens. Proc Natl Acad Sci USA 1987 May; 84: 10: 3405—3409.
 22. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. В.П. Фисенко. М.: ЗАО «ИИА «Ремедиум»; 2000; 398.
 23. *Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П.* Методы культуры ткани в гематологии. Томск; 1992; 264.
 24. *Cunningham A.J.* A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. Nature 1965; 207: 5001: 1106—1107.
 25. *Mizel S.B.* Studies on the purification and structure-function relationships of murine lymphocyte activating factor (Interleukin 1). Mol Immunol 1980; 17: 571—577.
 26. *Шерстобоев Е.Ю., Масная Н.В., Чурин А.А., Борсук О.С., Мартюшев А.В., Эпштейн О.И.* Иммуностропные свойства гомеопатических доз антител к интерферону- γ человека. Бюлл эксперим биол 2001; 3: 37—39.
 27. *Шерстобоев Е.Ю., Масная А.В., Чурин А.А., Борсук О.С., Бельский Ю.П., Мартюшев А.В., Осидак Л.В., Дриневский В.П., Эпштейн О.И.* Иммуностропные свойства сверхмалых доз антител к гамма-интерферону. Цитокин воспаление 2002; 1: 2: 40.
 28. *Головачева Е.Г.* Клинико-лабораторное обоснование применения иммунокорригирующей терапии при респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у детей. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. СПб.: 1998; 18.
 29. *Афанасьева О.И., Осидак Л.В., Головачева Е.Г., Милькинт К.К., Дриневский В.П., Образцова Е.В., Калинина Н.М., Эпштейн О.И.* Результаты изучения лечебной эффективности препарата «Анаферон детский» при гриппе у детей. Дет инфекц 2003; 2: 48—53.
 30. *Удилова Е.Е.* Клиника, иммунокорригирующая терапия и функциональное состояние Т-клеточного и фагоцититарного звеньев иммунитета при инфекционном мононуклеозе у детей. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Екатеринбург. 2007; 24.

Циклоферон в комплексе медикаментозных мероприятий при хроническом ларингите

Е. В. ДЕМЧЕНКО¹, М. Г. РОМАНЦОВ², С. С. ГРИГОРЯН, А. Л. КОВАЛЕНКО²

¹ ФГБУН НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва;

² ООО НТФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург

Cycloferon in Complex Medicamentous Management of Chronic Laryngitis

E. V. DEMCHENKO, M. G. ROMANTSOV, S. S. GRIGORYAN, A. L. KOVALENKO

N.F.Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

POLYSAN Co., St. Petersburg

Описано клиническое течение различных форм хронического ларингита, включая контактные гранулёмы, характеризующиеся не только упорным и рецидивирующим течением, но и склонностью к формированию онкологической патологии, за счёт гиперпластических изменений в гортани, приводящих к малигнизации воспалительного процесса. Установлено подавление интерферон-синтезирующей активности лейкоцитов более чем у 88,1% больных. Патогенные вирусы выявлены у 48,2% больных, причём преобладал EBV и микоплазма, показана высокая прямая корреляционная связь хронического ларингита с вирусами герпетической группы, а наличие трёхкомпонентных вирусных ассоциаций в слизистой оболочке гортани может указывать на трансформацию доброкачественного процесса в злокачественный. Обосновано включение в комплекс оперативно-медикаментозного сопровождения хронического ларингита индуктора интерферона — циклоферона, показано снижение числа рецидивов до 1,7 случая в год.

Ключевые слова: хронический ларингит, вирусы, циклоферон, рецидив.

The clinical course of various forms of chronic laryngitis, including contact granulomas not only persistent and relapsing, but also inclined to oncologic pathology due to hyperplastic changes in the larynx resulting in malignization was described. Inhibition of the leukocyte interferon-synthesizing activity was observed in more than 88.1% of the subjects. Pathogenic viruses were isolated from 48.2% of the patients, EBV and mycoplasma prevailing. High direct correlation between chronic laryngitis and *Herpes* viruses was shown. The presence of three-component virus associations in the larynx mucosa was likely indicative of the benign process malignancy. The use of the interferon inductor cycloferon in the complex surgical and medicamentous management of chronic laryngitis was shown valid. The rate of the relapses lowered to 1.7 episodes a year.

Key words: chronic laryngitis, viruses, cycloferon, relapses.

Проблема хронической воспалительной патологии гортани сохраняет актуальность в связи с широким распространением. Хронический ларингит характеризуется не только длительным и упорным течением, но на длительный срок лишает больных трудоспособности, приводит к инвалидности, предрасполагает к формированию онкологической патологии [1, 2]. Хронический ларингит — воспалительное заболевание гортани, составляет до 10% всех заболеваний ЛОР-органов, являясь полиморфной группой заболеваний, возникающих на фоне снижения специфической и неспецифической резистентности организма [3, 4]. Возникновение хронического ларингита связано с нарушением местного иммунитета слизистой оболочки гортани, в результате внешнего дли-

тельного воздействия токсических факторов, патогенной (вирусной, бактериальной, грибковой) инфекции, нарушением гомеостаза [5—7]. Контактная гранулёма относится к группе хронических ларингитов, характеризуется рецидивирующим течением, наблюдается у лиц речевых профессий и у пациентов, вынужденных перенапрягать свой голосовой аппарат, составляя до 4% всех голосовых нарушений. Хронический ларингит разнообразен по этиологии, патогенезу, клиническим проявлениям, гиперпластические изменения в гортани приводят к малигнизации воспалительного процесса [8].

О снижении иммунного ответа при хронических ларингитах свидетельствует множество исследований [4, 7, 9], без повышения иммунологической реактивности трудно добиться хорошего клинического эффекта при хронических воспалительных заболеваниях. В лечении хронического гиперпластического ларингита остается высо-

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 123098 Москва, ул. Гамалеи, д. 18. НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи

ким процент рецидивов, не отработана система этиопатогенетической терапии заболевания. Поэтому необходим поиск терапевтических средств, позволяющих усилить неспецифическую резистентность организма с получением стойкого терапевтического эффекта. Универсальность системы интерферона делает её важнейшим фактором неспецифической резистентности организма, обеспечивая при этом контрольно-регуляторную роль в сохранении гомеостаза. Привлекает внимание группа индукторов интерферона, обладающая теми же свойствами, что и интерферон, с отсутствием выраженных нежелательных реакций, присущих препаратам интерферона [10–12]. Лекарственная индукция интерферонов в организме осуществляется независимыми от патогенов путями, делая её эффективной, позволяя в условиях развивающегося блока противовирусного действия интерферонов, поддерживать клеточную защиту против активно развивающейся инфекции. К основным факторам защиты клеток от вирусной инфекции при активации интерферонов I типа относятся активация дс-РНК-зависимой протеинкиназы; олигоаденилат-синтетазы и РНКазы L; синтеза белка Мх, блокирующего активность вирусспецифической РНК-зависимой РНК-полимеразы [13]. Ранние индукторы интерферона I типа, на основе акридонуксусной кислоты (циклоферон), адресно транспортируются в клеточное ядро, где происходит процесс их накопления, увеличивая время пребывания препарата в клетках, повышая интерферониндуцирующую активность препарата. Препарат оказывает иммуностропное и антимикробное действие, запускает каскад реакций, приводящий к усилению синтеза интерферона, концентрация которого нарастает от 2 до 8 часов, превышая исходный уровень в 2,6–4 раза. Транскрипция гена мРНК интерферона-альфа уже к 6 часам от начала воздействия достигает максимума, превышая фоновый уровень в 29–44 раза, указывая на то, что индукция гена мРНК-ИФН есть первичный ответ клеток моноцитарной линии. Циклоферон, снижая эффект вирусиндуцированного блокирования синтеза собственных белков клетки на стадии внутриядерной сборки вирусных капсидов, блокирует инкорпорацию вирусной ДНК в пресформированные капсиды, а на поздней стадии репликативного цикла вируса препятствует «одеванию» вирусных капсидов в липопротеидную оболочку и выходу вирусного потомства [14–16].

Материал и методы

Под наблюдением находилось 230 больных различными формами хронического гиперпластического ларингита (длительностью заболевания от 2 до 30 лет), а также 30 пациентов с верифицированным диагнозом контактная гранулёма гортани. Для оценки функционального состояния голосового аппарата у

находившихся под наблюдением больных использовали методы ларингоскопии, микроларингоскопии, микроларингостробоскопии по общепринятым методикам. Оценивали индекс вибраторных нарушений. В соответствии с рекомендациями Союза европейских фонистров использовали оценку хриплости, учитывая периодичность силы голоса (по Yananagihara) [17]. Изучение иммунологического статуса проводилось с использованием набора моноклональных антител фирмы «Becton Dickinson» согласно приложенной инструкции по применению, анализ параметров интерфероновой ответа проведен по методике С. С. Григорян [18]. Диагностика инфекционных патогенов проводилась с помощью полимеразной цепной реакции (метод PCR) с использованием тест-системы «Ампли-Сенс» (Россия). ИФА-исследования, согласно инструкции к применению, проведены тест-системами производства «Вектор Бест» (Россия). Проведено эндоларингеальное микрохирургическое удаление гранулёмы методом высокочастотной электрохирургии — аргон-плазменной коагуляции [19]. Принцип метода заключается в термическом воздействии тока высокой частоты, подаваемого на ткани потоком ионизированной аргонной плазмы. Пациентам основных групп назначали циклоферон (меглумина акридонуксусат), согласно инструкции по его медицинскому применению, обладающий противовирусным, иммуностропным и антимикробным действием [14–16]. Лекарственная терапия, с применением циклоферона проведена 200 больным различными формами хронического ларингита, контрольную группу составили 30 пациентов, не получавших в комплексном лечении индуктор интерферона. В основу формирования основных и контрольной групп положен принцип стратификационной рандомизации (формирование групп проводилось по ведущему прогностическому признаку — форме хронического гиперпластического ларингита) [20].

Результаты исследований

Среди наблюдаемых 230 больных хроническим гиперпластическим ларингитом с длительностью заболевания от 2 до 30 лет, 147 человек (63,9%) — лица с повышенным требованием к качеству голоса. Группа больных представлена мужчинами — 188 (81,7%) человек, 18,3% (42 человека) составили женщины. Из 230 больных у 35 человек длительность заболевания составила до 2 лет, у 67 пациентов — до 5 лет, до 10 лет — у 82 человек, а свыше 10 лет — у 46 пациентов. Заболевание имело непрерывно-рецидивирующее и/или упорное рецидивирующее течение (с обострением до 8 раз в год). 179 (77,8%) больных — хронические курильщики, 27,8% — работали в условиях загазованности, непосредственно с химическими веществами. Охриплость, как основной клинический синдром, проявлялась постоянно, усиливаясь при голосовой нагрузке и, наблюдалась у всех больных. 156 (67,8%) больных отмечали появление различных видов парестезий в гортани и ротоглотке, доставляющие пациентам эмоциональные переживания. Боль в горле, непостоянного характера, наблюдалась у 40% пациентов, усиливалась после голосовой нагрузки. Кашель беспокоил 92 (40%) пациента, у 25 человек носил характер кратковременных приступов, а у 67 — проявлялся постоянно в течение суток. Затруднение дыхания (инспираторная одышка) наблюдалась у 14 пациентов (60%) с выраженными

Таблица 1. Состав микрофлоры слизистой оболочки гортани больных хроническим гиперпластическим ларингитом

Флора слизистой оболочки гортани	Количество больных (абс/%)				
	группы больных			всего, n=230	
	1-я n=(110)	2-я (n=79)	3-я (n=41)	абс	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	58/52,7	16/20,2	3/7,3	77	33,4
<i>S.epidermidis</i>	37/33,7	11/13,9	2/4,9	50	21,7
<i>Escherichia coli</i>	2/1,8	4/5,0	3/7,3	9	3,9
<i>S.aureus, S.epidermidis</i>	11/10,0	34/43,0	9/21,9	54	23,5
<i>S.aureus, Candida tropicalis</i>	—	3/3,8	2/4,9	5	2,2
<i>S.epidermidis, Candida albicans</i>	2/1,8	7/8,9	4/9,8	13	5,7
<i>Escherichia coli, Candida albicans</i>	—	1/1,3	3/7,3	4	1,8
<i>S.aureus, Candida zeylanoides</i>	—	1/1,3	5/12,2	6	2,6
<i>S.haemolyticus, Candida albicans</i>	—	2/2,6	6/14,6	8	3,5
<i>S.aureus, Klebsiella pneumoniae, Candida pseudotropicalis</i>	—	—	2/4,9	2	0,9
<i>S.aureus, Enterobacter cloacae, Cryptococcus neoformans</i>	—	—	1/2,5	1	0,4
<i>S.aureus, S.haemolyticus, Prototheca sp.</i>	—	—	1/2,5	1	0,4
Всего	110/100	79/100	41/100	230	100

Примечание. * — различия между частотой высеваемости в 2009 г. и 2012 г. статистически достоверны, $p < 0,00001$.

ми продуктивными формами воспаления гортани при физической нагрузке. У 81,0% больных отмечался хронический фарингит, у 48,2% больных преобладали различные формы хронического бронхита.

На основе результатов микроэндоларингоскопии (цвет эпителия, рельеф, прозрачность, состояние эпителиальных сосудов), позволяющей прогнозировать течение заболевания, выделены 3 клинических формы заболевания: простая инфильтративная (110 больных) — 1-я группа, диффузно-инфильтративная с очагами плоского кератоза (79 пациентов) — 2-я группа, очаговый кератоз с наличием гиперплазий и полиповидных утолщений — 3-я группа (41 человек). У пациентов с диффузно-инфильтративной формой поражения гортани длительность заболевания в 2 раза меньше ($82,2 \pm 16,7$ мес), чем у больных с очаговым кератозом ($168,1 \pm 29,7$ мес), а у пациентов с простой инфильтрацией голосовых складок, лишь у одного пациента длительность заболевания достигла $37,2 \pm 11,6$ мес., указывая на прогрессивное течение хронического гиперпластического ларингита, на переход одной стадии заболевания в другую.

Функциональные показатели голосового аппарата пациентов очаговым кератозом ниже ($p < 0,5$), чем у больных с инфильтративными изменениями, что позволяет предварительно установить стадию заболевания.

Микробный пейзаж слизистой оболочки голосовых складок изучен у всех 230 пациентов. Условно-патогенная флора с диагностически значимыми титрами ($> 10^4$ КОЕ/мл) не выявлена. Монокультура наблюдалась у 136 (59,1%) пациентов, в основном в группе с простой инфильтративной формой гиперпластического ларингита, у остальных больных с очагами кератоза выявлены различные микробные ассоциации (табл. 1). Моно-

культура у больных хроническим гиперпластическим ларингитом представлена в 3,9% случаев *Escherichia coli*. У 40 (17,4%) пациентов в состав микробной ассоциации входили грибы (род *Candida* в 16,5% случаев). Таким образом, преобладала условно-патогенная флора у больных простой инфильтративной формой, у пациентов различными очагами кератоза также выявлены условно-патогенные возбудители.

Вирусологическое тестирование показало наличие вирусных агентов у 48,2% больных гиперпластическим хроническим ларингитом (табл. 2.) У больных с простой инфильтративной формой вирусы обнаружены в 13,6% случаев, среди них в 86,7% случаев определялись вирусы герпетической группы, только в 2 случаях — микоплазма. У пациентов с диффузно-инфильтративной формой заболевания вирусы выявлены у 55 (69,6%) больных, в 72,7% виде монослучаев, а у 37,5% (15 человек) выявлены вирусно-вирусные и вирусно-микоплазменные ассоциации. Основным агентом явился вирус Эпштейна-Барр (EBV). У всех пациентов с диффузным и очаговым кератозом (3-я группа) выявлено наличие вирусов, у 13 (31,7%) больных EBV и микоплазма, у 9 человек вирусно-вирусные и у 13 человек вирусно-микоплазменные ассоциации.

Изучение серологических маркеров вирусов герпеса свидетельствуют об инфицированности EBV 78—83% больных хроническим гиперпластическим ларингитом. Антитела к ранним белкам EBV выявлены у 3,6% пациентов с простой инфильтративной формой, у 10,1% — с диффузно-инфильтративной и у 24,4% пациентов с очаговой формой кератоза. Аналогичная тенденция наблюдалась при скрининге на EBV-специфические антитела IgM-класса (выявлены лишь у больных 2-й (2,5%) и 3-й (12,2%) групп). Тестирование больных на маркеры микоплазменной инфекции (спе-

Таблица 2. Вирусы, выявленные в слизистой оболочке гортани у больных хроническим гиперпластическим ларингитом, в сочетании с микоплазмой и хламидиями

Вирусы	Количество больных				
	Группы больных ХГЛ			Всего: n=230	
	1-я (n=110)	2-я (n=79)	3-я (n=41)	абс	%
Вирус простого герпеса 1-го типа	1/0,9	—	—	1	0,4
Вирус простого герпеса 2-го типа	1/0,9	—	—	1	0,4
Герпес вирус 6-го типа	3/2,7	2/2,6	—	5	2,2
Цитомегаловирус	2/1,8	1/1,3	—	3	1,3
Эпштейна Барр вирус	6/5,5	26/32,9	9/21,9	41	17,8
Микоплазма	2/1,8	11/13,9	4/9,8	17	7,4
Эпштейна Барр вирус, микоплазма	—	10/12,6	13/31,8	23	10,0
Эпштейна Барр вирус, герпес вирус 6-го типа	—	4/5,0	6/14,6	10	4,3
Эпштейна Барр вирус, цитомегаловирус	—	1/1,3	3/7,4	4	1,8
Эпштейна Барр вирус, микоплазма, Хламидии	—	—	3/7,4	3	1,3
Эпштейна Барр вирус, микоплазма, вирус папилломы человека	—	—	2/4,8	2	0,9
Эпштейна Барр вирус, цитомегаловирус, микоплазма	—	—	1/2,4	1	0,4
Всего	15/13,6	55/69,6	41/100	111	48,2

Таблица 3. Показатели интерферонового ответа у больных хроническим гиперпластическим ларингитом

Типы ИФН	Уровень нормы (Ед/мл)	Контрольная группа больных n=35	Группы больных ХГЛ		
			1-я (n=110)	2-я (n=79)	3-я (n=41)
Сывороточный ИФН	5±3,0	4,33±3,75	6,63±4,5 [#]	8,78±7,5 [#]	21,51±18,9 [#]
Спонтанный ИФН	<2	2,06±0,36	2,05±0,32	2,12±0,49	2,24±0,6
Альфа-ИФН	960±320	273,45±112,8	273,44±112,8 ^{*,#}	218,28±195,3 ^{*,**,#}	82,92±63,9 ^{*,#}
Гамма-ИФН	96±32	62,83±29,4	62,83±39,4 ^{*,##}	21,77±12,0 ^{*,###}	9,46±7,5 ^{*,#}

Примечание. [#] — ($p < 0,001$) в сравнении с контролем; * — $p < 0,01$ разница между показателями больных 2-й и 3-й групп; ** — $p < 0,05$ — ^{##} — $p < 0,001$ разница между показателями больных 1-й и 2-й групп. Контрольная группа больных представлена пациентами, у которых отсутствовали хронические воспалительные заболевания, а на момент обследования и острые заболевания.

цифические антитела класса IgG) показало их наличие у больных 3-й группы (12,2%), а специфические IgG и М-хламидийные антитела выявлены у пациентов 3-х групп (15—5%). Наблюдается рост частоты встречаемости маркёров инфекции у больных, что обусловлено активацией латентных вирусов герпес группы, подавлением иммунного ответа у наблюдаемых больных на фоне трансформации острой формы заболевания в хроническое течение.

Индивидуальный анализ параметров иммунного ответа показал, что у больных 1-й группы изменений не выявлено. У пациентов 2-й и 3-й групп наиболее подвержено изменениям Т-клеточное звено иммунитета, иммунорегуляторный индекс — показатель гармоничности функций клеточного иммунитета, изменен более чем у половины больных за счёт снижения уровня CD4+ лимфоцитов (в 1,2—1,4 раза), выраженной лимфопении (от 1,7 до $2,0 \times 10^9/\text{л}$) и разнонаправленных отклонений содержания CD8+клеток. Отмечен дисбаланс интерфероновых показателей (табл. 3) у больных с различными формами хронического гиперпластического ларингита.

Средний уровень сывороточного ИФН у больных ХГЛ повышен ($p < 0,01$) в сравнении с па-

циентами контрольной группы (табл. 3). У 16 (14,5%) пациентов 1-й группы, у 18 (22,7%) — 2-й и у 26 (63,4%) пациентов 3-й группы его уровень оказался > 8 Ед/мл. Спонтанная продукция ИФН была повышена у 3 (2,7%) пациентов 1-й группы, у 5 (6,3%) — 2-й и у 4 (9,7%) — 3-й группы. Повышенная спонтанная продукция ИФН и высокий титр сывороточного ИФН указывали на обострение рецидивирующей вирусной инфекции.

Синтез альфа-ИФН у пациентов с простыми инфильтративными изменениями голосовых складок соответствовал уровню нижней границы нормы только у 5 (4,5%) обследуемых, у 95,5% больных 1-й группы показатель альфа-ИФН ниже нормы (в 2—8 раза), составив от 80 до 160 Ед/мл, менее 80 Ед/мл уровень альфа-ИФН отмечен лишь у 2-х больных (1,8%). У пациентов 2-й группы нормальные значения продукции альфа-ИФН выявлены у 11 (13,9%) больных, у 31 (39,2%) колебались от 160 до 320 Ед/мл, а у 37 (46,8%) соответствовали 40–80 Ед/мл. У пациентов 3-й группы показатель продукции альфа-ИФН снижен относительно контроля у всех больных, у 14,6% больных титры альфа-ИФН колебались от 160 до 320, а у 35 (85,4%) — от 40 до 80 Ед/мл (табл. 3). В целом, средние значения обра-

Таблица 4. Результаты лечения больных ХГЛ

Наблюдаемые группы	Подгруппы	Исход заболевания, %		
		выздоровление	улучшение	без изменений
1-я (n=110)	Основная	81,0	19,0	—
	Контрольная	30,0	50,0	20,0
2-я (n=79)	Основная	56,5	40,6	2,9
	Контрольная	20,0	50,0	30,0
3-я (n=41)	Основная	25,8	58,1	16,1
	Контрольная	10,0	40,0	50,0

зования альфа-ИФН больных трёх наблюдаемых групп ниже уровня контроля (в 2, 3 и 8 раз соответственно). Значимой корреляционной связи между процессом образования альфа-ИФН с видом инфицирования и частотой рецидивов не обнаружено. Отмечена высокая прямая корреляционная связь между длительностью заболевания и подавлением продукции альфа-ИФН ($r=0,982$). Средние показатели продукции гамма-ИФН снижены у пациентов 1-й, 2-й и 3-й групп соответственно в 1,7, 5 и 12 раз в сравнении с группой контроля, отражая угнетение функциональной активности Т-лимфоцитов. Выявлены различия в распределении больных наблюдаемых групп по продукции гамма-ИФН ($p<0,001$). У 74,5% (82 чел) пациентов с простой инфильтрацией голосовых связок титры гамма-ИФН колебались от 32 до 64 Ед/мл, у 96,2% (76 чел) пациентов диффузно-инфильтративными изменениями голосовых связок титр гамма-ИФН колебался от 16 до 32, а у 3 больных — до 8 Ед/мл. Значительное снижение продукции гамма-ИФН отмечено у больных с катарозом и наличием гранулём и полиповидных утолщений (3-я группа). 36,5% (15 чел) обследованных имели титры гамма-ИФН до 32 Ед/мл, 20 больных (48,7%) — до 8 Ед/мл, а у 6 (14,6%) титры гамма-ИФН составили 2 Ед/мл.

Выраженные нарушения в системе ИФН, дисбаланс клеточного иммунитета, смешанный характер инфицирования с преобладанием вирусно-микоплазменных ассоциаций явились основанием для применения индукторов интерферона в необходимом комплексе лечебных мероприятий, включающего эндоларингеальную микрохирургию, специальные фониатрические методы терапии. Для применения выбран циклоферон, обладающий наиболее выраженными интерферониндуцирующими свойствами, поскольку при определении чувствительности в тесте *in vitro* у всех больных установлен его корригирующий эффект. 45 (19,5%) больных, с наличием микоплазменной и хламидийной инфекции, помимо циклоферона, включен сумамед (в дозах, согласно инструкции по медицинскому применению), к которому чувствительны хламидии и микоплазма.

Основным критерием эффективности лечения ХГЛ явилось отсутствие рецидивов у наблюдаемых больных в отдалённые (от 6 мес до 3 лет)

сроки наблюдения. Критерием клинического выздоровления считали нормализацию голосовой функции, определяемую на слух, улучшение акустических показателей голоса и нормализацию ларинго- и микроларингостробоскопической картины. Критерием улучшения служили отсутствие образований на голосовых складках, уменьшение степени охриплости, нестойкое улучшение акустических показателей.

Функциональное состояние голосового аппарата (время максимальной фонации, интенсивность голоса), после проведённого лечения значительно восстановилось и сохраняло свою устойчивость в сравнении с исходными данными.

Голос с нормальным тембром, в результате использования комплексного лечения с применением циклоферона, получен у 81% больных 1-й группы, у 56,5% — 2-й и у 25,8% пациентов 3-й группы против 30, 20, 10% пациентов в контрольных группах соответственно (табл. 4).

Исследование параметров интерфероновой реакции после лечения показало повышение интерферониндуцирующей функции лейкоцитов: прирост продукции альфа-ИФН у 205 (89,1%) больных с 640,0 Ед/мл до 1280,0 Ед/мл; а прирост продукции гамма-ИФН у 199 (86,5%) больных с 640 Ед/мл до 1280 Ед/мл у пациентов основной группы, в сравнении с пациентами контрольной группы, у которых показатели оставались на уровне исходного обследования (от 20 до 640 Ед/мл по альфа и от 60,0 до 320,0 Ед/мл по гамма-ИФН) ($p<0,01-0,001$).

Позитивный эффект терапии сохранялся и в отдалённом периоде (табл. 5). Среди больных простой инфильтративной формой к третьему году наблюдения рецидив заболевания отмечен у 3 (3,8%), не менее стойкими оказались результаты пациентов 2-й и 3-й групп, составив 1,7 и 2,9%, всего 3,0%, против 16,7, 20,0 и 13,4% соответственно в контрольной группе.

Среди наблюдающихся 30 больных контактной гранулёмой 86,6% из них имели постоянную профессиональную голосовую нагрузку (административно-управленческий персонал, военные). Во время громкой речи голосовые отростки черпаловидных хрящей как «молот и наковальня» ударяются друг о друга, образуя дефект эпителия в межчерпаловидном пространстве с формированием грануляционной ткани, которая морфоло-

Таблица 5. Отдалённые результаты лечения больных ХГЛ с использованием циклоферона

Группы больных (форма заболевания)	Число рецидивов в год после лечения, абс./%		
	1 год	2 года	3 года
1-я (простая инфильтративная), $n=78$	5/6,4	3/3,8	3/3,8
2-я (диффузно-инфильтративная), $n=56$	3/5,3	4/7,1	1/1,7
3-я (очаговый кератоз с наличием гиперплазий и полипов), $n=34$	3/8,8	3/8,8	1/2,9
Всего $n=168$	11/6,5	10/6,0	5/3,0
Контрольная группа, $n=30$	5/16,7	6/20,0	4/13,4

Таблица 6. Параметры интерферонового ответа у больных контактной гранулёмой

Показатели ИФН ответа	Норма, Ед/мл	Пациенты контрольной группы ($n=30$)	Больные гранулёмой ($n=30$)
Сывороточный ИФН	$5,0 \pm 3,0$	$4,33 \pm 3,75$	$10,33 \pm 8,1^{***}$
Спонтанный ИФН	$<2,0$	$2,06 \pm 0,36$	$2,28 \pm 0,69$
Альфа-ИФН	$960,0 \pm 320,0$	$656,0 \pm 198,64$	$194,6 \pm 145,1^{***}$
Гамма-ИФН	$96,0 \pm 32,0$	$110,93 \pm 55,1$	$21,86 \pm 11,3^{***}$

Примечание. $p < 0,001$ в сравнении с пациентами контрольной группы.

гически представляет собой соединительную ткань, богатую сосудами [19–21].

Среди предъявляемых жалоб больные отмечали выраженные болевые ощущения в области гортани (100%), у 80% пациентов имело место «наличие комка в горле» и появление у 46,6% пациентов периодического кашля с прожилками крови в отделяемой мокроте, лишь 20% наблюдаемых больных жаловались на охриплость голоса, которая усиливалась при длительной голосовой нагрузке. Длительность заболевания составляла более 6 месяцев. Фонационное дыхание нарушено у всех наблюдаемых больных, в основном отмечался верхне-грудной тип дыхания с шумным поднятием грудной клетки и плеч, быстрое расходование воздуха на первых словах фразы, возникала одышка. При ларингоскопии у больных на голосовом отростке черпаловидного хряща определялась грибовидная опухоль серо-красного цвета, располагающаяся между голосовыми отростками. На медиальной поверхности имелось небольшое углубление, а на противоположной стороне в области голосового отростка наблюдали изъязвление и инфильтрацию слизистой оболочки, голосовые складки утолщены, мутные с сосудистыми изменениями по свободному краю. Степень охриплости голоса полностью зависела от величины контактной гранулёмы, при фонации отмечалось неполное замыкание голосовой щели, а её форма напоминала треугольник, образующийся в задней трети. «Недосмыкание» голосовых складок зависело от величины имеющегося образования. При микроларингоскопическом исследовании непосредственно области гранулёмы наблюдали непрозрачный, мутный эпителий с размытыми контурами сосудов, наблюдали наличие очагов плоского кератоза и белесые чётко отграниченные бессосудистые участки, покрытые тонким роговым налётом, указывая на хронический воспалительный процесс. Нарушения фо-

наторных колебаний (равномерные значительно уменьшенные по амплитуде и частоте) отмечены у 4 больных с большими размерами контактной гранулёмы, колебания голосовых складок были асинхронные, носили быстро затухающий характер на стороне поражения с уменьшением амплитуды и увеличением смещения слизистой оболочки по свободному краю. Индекс вибраторной недостаточности голосовых связок составил $1,80 \pm 0,62$, а длительность времени максимальной фонации гласных звуков колебалась от 10 до $17,2 \pm 0,5$ сек. Уровень звукового давления (интенсивность голоса) снижен и колебался от 63,9 до $68,3 \pm 0,4$ дБ.

У пациентов наблюдалась тенденция к увеличению иммунорегуляторного индекса, уменьшению числа НК-клеток, что расценивалось как функциональный дисбаланс, а исследование параметров интерферонового ответа позволило у больных выявить значительные нарушения (табл. 6).

Содержание сывороточного ИФН больных контактной гранулёмой голосовых складок составило $10,33 \pm 8,13$ Ед/мл, превышая в 2,4 раза показатели пациентов контрольной группы, при этом у 17 человек уровень сывороточного ИФН колебался от 2 до 8 Ед/мл, а у 13 пациентов в 6,4 раза превышал показатель нормы (32 Ед/мл). По уровню спонтанной продукции ИФН при индивидуальном анализе выявлено повышение показателя у 13,3% больных до 4 Ед/мл на фоне высоких титров сывороточного ИФН до 32 Ед/мл, свидетельствуя об обострении рецидивирующей вирусной инфекции. Только у 6,6% пациентов определялся нормальный уровень (640 Ед/мл) альфа-ИФН, у остальных больных (66,6%) значения снижены в 3,4 раза, относительно пациентов контрольной группы, составив 320 Ед/мл, очень низкая продукция альфа-ИФН (80 Ед/мл) выявлена у 26,6% больных. В целом, средние значения альфа-ИФН ниже уровня пациентов контрольной группы в 3

Таблица 7. Маркёры EBV у больных с контактными гранулёмами гортани (метод ИФА)

Вирус	Маркёр вируса	Количество больных с положительным результатом	
		абс.	%
EBV	ДНК	23	76,6
	IgG	25	83,3
	IgG ранние	7	23,3
	IgM капсидный	7	23,3

раза. Средние показатели продукции гамма-ИФН снижены в 5 раз, отражая подавление функциональной активности Т-лимфоцитов, при этом у 93% больных титры гамма-ИФН составили 16 Ед/мл, а у 6,6% пациентов — 8 Ед/мл.

Патогенная микробная флора у больных с контактными гранулёмами в 70% случаев обнаружена в виде монокультуры *S.aureus* и *S.epidermidis*, в 30% случаев — микробные ассоциации стафилококков с грибами, включая *Torulopsis candida* и *Prototheca nickelhamii*. Вирусологическое обследование показало присутствие ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV) у 76,6% больных, в 23,3% случаев выявлены антитела IgM и к ранним белкам EBV вместе с ДНК возбудителя, свидетельствуя об активности инфекционного процесса. Выявление маркёров EBV (табл. 7) указывает на инфицированность порядка 80% пациентов. Синтез иммуноглобулинов в основном представлен IgG (83,3%), а специфические антитела к ранним белкам и к капсидному IgM EBV циркулируют в периферической крови в незначительных концентрациях (23,3%).

Таким образом, констатировано наличие хронического воспалительного процесса в гортани при контактных гранулёмах и наличие EBV-инфекции. Биологическое взаимопотенцирование вирусно-микробных-грибковых ассоциаций позволяет предположить их участие в развитии рецидивов (разрастание грануляционной ткани) заболевания, что позволило нам определить тактику лечения больных с включением индуктора эндогенного интерферона (циклоферона).

Основным показателем эффективности лечения больных контактной гранулёмой считали отсутствие рецидивов, динамика показателей интерфероновой реакции, оценка функционального состояния гортани (нормализация показателей микроларингостробоскопических параметров). Через 2 месяца рецидив контактной гранулёмы отмечен у 6,6% больных, что связано с несоблюдением голосового режима в послеоперационном периоде. Через 6 месяцев после лечения средняя степень охриплости сохранилась у 16,7% больных с сохранением функциональных нарушений голоса. С учётом профессиональной деятельности (работа связана с напряжением голоса и голосовой перегрузки) пациентов с ними проведён курс фонопедических занятий (обучение правильным навыкам голосообразования и голосоведения)

длительностью до 3 месяцев. При контрольном осмотре через 1 год рецидива контактных гранулём не выявлено. Оценивая изменения параметров интерфероновой реакции, установлено повышение в 3,2 и 4,5 раза интерферониндуцирующей активности лейкоцитов.

Заключение

Группа больных хроническим гиперпластическим ларингитом представлена в основном мужчинами трудоспособного возраста, с длительностью заболевания от 2 до 10 лет, с упорным рецидивирующим и/или непрерывно-рецидивирующим течением заболевания (обострения до 8 раз в год). Большинство пациентов злоупотребляло курением, некоторые из больных работали непосредственно с химическими веществами. Все пациенты имели хроническую сопутствующую патологию, что не только усугубляло тяжесть голосового нарушения, влияло на качество проводимого лечения, косвенным образом указывая на нарушение неспецифической резистентности и адаптивного (приобретённого) иммунитета. Патогенные вирусы выявлены у 48,2% наблюдаемых больных, преобладал EBV и микоплазма (17,8 и 7,4% соответственно). Микствирусы выявлены у пациентов 2-й и 3-й групп. Показана высокая прямая корреляционная связь гиперпластического хронического ларингита и наличием патогенных вирусов ($r=0,98$). Наличие трёхкомпонентных ассоциаций в слизистой оболочке гортани может указывать на вероятную трансформацию доброкачественного процесса в злокачественный, являясь важным диагностическим критерием канцерогенеза. Угнетение интерферон-синтезирующей способности лейкоцитов проявлялось снижением продукции альфа-ИФН у 95,5% больных 1-й, у 88,1% — 2-й группы и у всех больных 3-й группы. Средний уровень продукции гамма-ИФН был снижен у пациентов наблюдаемых групп в 1,7, 5 и 12 раз соответственно. Клиническое выздоровление, в зависимости от формы ХГЛ, с использованием циклоферона в комплексном лечении больных колебалось от 81,0 до 25,8%, число рецидивов к концу 3-го года наблюдения составило от 3,8 до 1,7 случаев.

Особой группой стоят 6 (2,6%) пациентов, у которых выявлены трёхкомпонентные ассоциации (вирусно-микоплазменно-хламидийные), у этих пациентов в течение годового наблюдения,

несмотря на проводимое лечение и отрицательные первые биопсии, выявлен рак гортани.

Учитывая полученные данные, целесообразно рекомендовать противорецидивное лечение пациентам с ХГЛ по окончании 2 лет катамнестического наблюдения. Эффективность лечения контактных гранулём гортани позволяет рекомендовать метод в практику здравоохранения,

ЛИТЕРАТУРА

1. *Brandt R., Weidner I.* The control of chronic laryngitis by endoscopic and histomorphologic methods. *Z Erkr Atmungsorgane* 1980; 55: 1: 103—108.
2. *Cupic H.* Epithelial hyperplastic lesions of the larynx in biopsy. *Acta Otolaryngol* 1997; 527: 3: 103—104.
3. *Ермолаев В.Г., Преображенский Б.С., Рутенбург Д.М.* Хирургические болезни глотки, гортани, трахеи, бронхов, пищевода. М.: 1954.
4. *Демченко Е.В.* Этиология, клиника и лечение хронических ларингитов. Автореф. дисс. д.м.н., М.: 2003; 46.
5. *Василенко Ю.С.* Хронический отечно-полипозный ларингит. Материалы конференции. Казань. 2000; 9—14.
6. *Тулиев А.В.* Ранняя диагностика, клиничко-функциональная характеристика и лечение заболеваний гортани на примере рабочих резиново-технического производства. Автореф. дисс. ... к.м.н. 1984; 14.
7. *Алимов А.И.* Хронический гиперпластический ларингит (этиология, патогенез, клиника, диагностика и лечение). Автореф. дисс. ... д.м.н. М.: 1973; 31.
8. *Иванченко Г.Ф.* Кератозы гортани, клиника и тактика лечения. Воспалительные заболевания уха и верхних дыхательных путей. М.: 1983; 66—70.
9. *Быкова В.П.* Лимфоэпителиальные органы в системе местного иммунитета слизистых оболочек. *Архив патол* 1995; 1: 11—16.
10. *Ершов Ф.И.* Система интерферона в норме и патологии. М.: 1996; 11—20.
11. *Ершов Ф.И., Киселев О.И.* Индукторы интерферона как антивирусные препараты этиотропного действия. Индукторы интерферона (от молекул до лекарств). М.: 2005; 211—227.
12. *Григорян С.С.* Индукторы интерферона: итоги и перспективы // Интерферону 50 лет. М.: 2007; 66—71.
13. *Киселев О.И., Ткаченко Б.И., Ершов Ф.И.* Индукция интерферонов: новые подходы к созданию функциональных индукторов. Фундаментальные направления направления молекулярной медицины. СПб.: 2005; 269—320.
14. *Романцов М.Г., Ершов Ф.И., Коваленко А.Л.* Индукторы интерферона. Иммунология. 1998; 6: 43—44.
15. *Казаков А.А., Коваленко А.Л.* Исследование внутриклеточной локализации циклоферона, связывания его с ДНК и стимуляции экспрессии цитокинов в клетках при воздействии циклоферона. Цитология. 2000; 6: 659—664.
16. *Коваленко А.Л.* Фармакологическая активность оригинальных лекарственных препаратов на основе 1-дезоксигуанидина-1-метиламина-2-глюцинола. Автореф. дисс. ... д.б.н. СПб.: 2005; 48.
17. *Weiser M., Glasen B.* Randomisierte plazebokontrollierte Doppelblindstudie zur Untersuchung der klinischen Wirksamkeit der homöopathischen Euphorbium compositum Nasentropfen S bei chronischer Sinusitis. *Forsch Komplementarmed* 1994; 1: 251—259.
18. *Григорян С.С., Ершов Ф.И.* Методические принципы определения интерферонового статуса. Система интерферона в норме и патологии. М.: 1996; 147—155.
19. *Цветков Э.А., Павлов П.В., Савин А.Н.* Использование аргонплазменной коагуляции в хирургии папилломатоза гортани и трахеи. *Росс оториноларингол* 2002; 1: 93.
20. *Cherry J., Margulies S.* Contact ulcer of the larynx. *S Laryngoscope* 1968; 78: 1937—1940.
21. *Paulo P., Kyrrillos L. et.al.* Importance of glottis configuration in the development of posterior laryngeal granuloma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001; 110: 765—769.

Рациональная антимикробная терапия хронического бактериального простатита

С. В. ПОПОВ

ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН, Москва

Rational Antimicrobial Therapy of Chronic Bacterial Prostatitis

S. V. POPOV

Research Centre of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Введение

Хронический простатит (ХП) принадлежит к числу часто встречающихся урологических заболеваний. До 35% мужчин в возрасте от 20 до 40 лет, обращающихся к врачу по поводу урологических проблем, страдают от симптомов ХП. На долю хронического бактериального простатита (ХБП) приходится 5—15% случаев заболевания. Пока вопросы диагностики и лечения ХП продолжают оставаться актуальными и дискуссионными, а значит, до конца не решёнными для большинства урологов, это заболевание продолжает вызывать значительные социальные и экономические проблемы у мужчин репродуктивного и сексуального активного возраста [1—4].

Этиология, патогенез, диагностика ХП

Наиболее распространёнными, по мнению большинства исследователей, этиологическими агентами ХБП являются такие грамотрицательные бактерии семейства Enterobacteriaceae, как *Escherichia coli*, которые обнаруживают в 65—80% случаев инфекций. Различные виды *Serratia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* выявляют в 10—15%. Большинство исследователей полагает, что на долю *Enterococcus faecalis* приходится от 5 до 10% подтверждённых инфекций простаты [5].

В настоящее время продолжают дискуссии о роли грамположительных бактерий — коагулазонегативных стафилококков и стрептококков при ХБП. По данным Е. Б. Мазо и соавт., основанным на результатах микробиологического исследования в виде четырёхстаканного теста Meares—Stamey у 164 больных ХБП, именно коагулазонегативным стафилококкам принадлежит ведущее (58%) этиологическое значение. Между тем на долю грамотрицательных патогенов приходится 27% случаев ХБП, а 15% составляют

больные с *Enterococcus faecalis* [6]. Аналогичными данными располагают М. Ф. Трапезникова и соавт., суммировавшие результаты идентификации 662 штаммов микроорганизмов у 264 больных ХБП. При этом выявлена ведущая роль грамположительных кокков в этиологии ХБП: частота распространения коагулазонегативных стафилококков составила 87,5% [7]. С. Н. Калинина, В. П. Александров, О. Л. Тиктинский при обследовании 174 больных ХБП также выявили преобладание (82%) грамположительной флоры [8]. А. И. Неймарк и соавт. исследовали состав микрофлоры отделяемого уретры и секрета предстательной железы у больных ХБП, а также биологические свойства и факторы патогенности выделяемых стафилококков. В результате обследования 75 больных ХБП и изучения 153 штаммов микроорганизмов оказалось, что наиболее часто из секрета предстательной железы выделяются грамположительные микроорганизмы, преимущественно *Staphylococcus* spp. и *Enterococcus* spp. Выделенные микроорганизмы обладали секретирруемыми факторами патогенности и множественной антибиотикорезистентностью, что могло способствовать их персистенции в тканях предстательной железы и уретре [9]. По данным М. И. Когана и соавт., у 105 больных в возрасте 20—45 лет с диагнозом ХБП в 95% случаев из секрета предстательной железы выделяли смешанную бактериальную микрофлору, представленную как факультативно-анаэробными, так и анаэробными бактериями [10].

В этиологической структуре ХБП доминировали неклостридиальные анаэробы, которые обнаруживали у 100% больных, коагулазонегативные стафилококки выделяли из СПЖ у 88% пациентов, коринеформные бактерии регистрировали в 65% случаев. Доля представителей семейства Enterobacteriaceae, которые, по данным отечественных и зарубежных исследователей, признаны ведущим этиологическим фактором бактериального простатита, была незначительной (10%) [10].

© С. В. Попов, 2013

Адрес для корреспонденции: Москва 125367, Волоколамское шоссе, д. 80. Научный центр неврологии РАМН

Инфекция простаты может быть следствием бактериальной колонизации мочеиспускательного канала. Нормальная флора мочеиспускательного канала у мужчин состоит, главным образом, из дифтероидов и грамположительных кокков. Сексуальная активность может способствовать колонизации мочеиспускательного канала потенциальными уропатогенами. N. J. Blacklock (1974) и T. A. Stamey (1980) отметили, что секрет простаты у некоторых мужчин с ХБП содержал те же уропатогены, которые были в вагинальной флоре их сексуальных партнёров. Бактериальная колонизация может также вызвать персистенцию бактерий в простате. Отличительной чертой этого состояния является персистенция бактерий внутри простаты, несмотря на лечение антибиотиками, что связано с хроническим воспалением, и склонностью к обострению инфекции мочевыводящего тракта, обусловленной тем же самым патогеном.

К предрасполагающим факторам ХБП относятся: уретропростатический рефлюкс; фимоз; анально-генитальные сношения без предохранения; инфекции мочевых путей; острый эпидидимит; постоянные уретральные катетеры и проведение трансуретральных операций у мужчин с инфицированной мочой без предшествующей антимикробной терапии [11]. У пациентов с ХП может быть выявлено нарушение секреторной функции простаты, характеризующееся изменением состава секрета, то есть снижением уровней фруктозы; лимонной кислоты; кислой фосфатазы; катионов цинка, магния и кальция; цинксодержащего антибактериального фактора простаты, при увеличении таких показателей, как рН, соотношения изоферментов лактатдегидрогеназы-5 к лактатдегидрогеназе-1, белков воспаления — церулоплазмину и компонента комплемента С3. Эти изменения в секреторной функции простаты также обуславливают неблагоприятное воздействие на антибактериальную, в норме, природу секрета простаты. Уменьшение антибактериального фактора простаты может снижать врождённую противобактериальную активность секрета, тогда как щелочной показатель рН может препятствовать диффузии в ткань и в секрет простаты основных антимикробных препаратов.

Симптомами ХП являются боли в тазовой области, расстройства мочеиспускания и эякуляции (табл. 1).

Ведущее место в лабораторной диагностике ХБП принадлежит микробиологическому исследованию — четырёхстаканному локализационному тесту, предложенному в 1968 г. Meares и Stamey. Он состоит в получении, после тщательного туалета наружных половых органов (во избежание контаминации поверхностными бактериями), первой (10 мл) и второй (средней) порций мочи для бактериологического исследования, массажа простаты с получением секрета для микроскопии и посева, а также третьей порции мочи (после взятия секрета) для посева. Количественные посевы первой и второй порции мочи выявляют бактерии в уретре и мочевом пузыре, в то время как при посевах секрета простаты и порции мочи после взятия секрета (третьей порции мочи) выявляют флору простаты [12]. ХБП характеризуется воспалительной реакцией: в секрете при микроскопии определяется более 10 лейкоцитов в поле зрения при большом увеличении. После инкубации посевов подсчитывают количество колоние-образующих единиц (КОЕ).

Бактериологическое подтверждение ХБП проводят на основании по крайней мере одного из следующих критериев, предложенных K. G. Naber [5]:

- третья порция мочи или образец секрета простаты содержат бактерии одного штамма в титре 10^3 КОЕ/мл и более при условии стерильной второй порции мочи;
- третья порция мочи или образец секрета простаты содержат количество бактерий, десятикратно превышающее количество бактерий (КОЕ/мл) второй порции мочи;
- третья порция мочи или образец секрета простаты содержат более 10^3 КОЕ/мл истинных уропатогенных бактерий, отличных от других бактерий во второй порции мочи.

Образец характерной для ХБП диаграммы патогенов представлен в табл. 2.

Чёткое следование правилам микробиологической диагностики и вышеуказанным критериям интерпретации результатов локализационного теста Meares—Stamey на большом количестве на-

Таблица 1. Симптомы хронического простатита

Боли в тазовой области	Расстройства мочеиспускания	Расстройства эякуляции
В промежности	Учащённое мочеиспускание	Боли во время или после эякуляции
В половом члене	Неполное опорожнение мочевого пузыря	Гемоспермия
В яичках	Слабая или прерывистая струя мочи	
В паховой области	Боль или её усиление во время мочеиспускания	
Над лоном		
В прямой кишке		
В крестце		

Таблица 2. Пример диаграммы патогенов, характерной для хронического бактериального простатита

Образцы	КОЕ/ мл
Первая порция мочи	$<10^3$
Вторая порция мочи	$<10^3$
Секрет простаты	$\geq 0^4$
Третья порция мочи	$\geq 10^3$

Таблица 3. Антимикробные препараты для лечения хронического бактериального простатита и способы их применения (Российские национальные рекомендации «Антимикробная терапия и профилактика инфекций почек, мочевыводящих путей и мужских половых органов», 2013)

Группа препаратов	Препараты	Способы применения
Фторхинолоны	Левифлоксацин	По 500 мг 1 раз в сутки 3—4 недели
	Офлоксацин	По 400 мг 2 раза в сутки 3—4 недели
	Ципрофлоксацин	По 500 мг 2 раза в сутки 3—4 недели
Тетрациклины	Доксициклина моногидрат	По 100 мг 2 раза в сутки 2 недели
Макролиды	Азитромицин	По 250—500 мг 1 раз в сутки 2 недели
	Джозамицин	По 500 мг 3 раза в сутки 2 недели

блюдений позволит более точно определить частоту встречаемости истинных патогенов ХБП.

Антимикробная терапия ХБП

После идентификации этиологического агента и определения антибиотикорезистентности возникает необходимость назначения больному с ХБП антимикробной терапии. К факторам, оказывающим влияние на выбор антимикробного препарата для лечения ХБП, относятся: чувствительность идентифицированного микроорганизма к антибиотику, его способность в достаточной концентрации проникать через гематопростатический барьер и накапливаться в ткани и секрете простаты, сперме, а также способность препарата преодолевать экстрацеллюлярную полисахаридную оболочку, формируемую микроколониями бактерий, и хорошая переносимость при длительном пероральном приёме [12, 13]. Идеальный антибактериальный препарат для лечения ХБП должен быть жирорастворимым, слабощелочным, с коэффициентом диссоциации, способствующим максимальной концентрации препарата в простате. Антимикробные препараты из группы фторхинолонов на сегодняшний день отвечают вышеперечисленным требованиям и являются препаратами выбора для лечения ХБП. Согласно Российским национальным рекомендациям по антимикробной терапии и профилактике инфекций почек, мочевыводящих путей и мужских половых органов, опубликованным в 2013 г., препаратами выбора для лечения ХБП являются левофлоксацин, офлоксацин и ципрофлоксацин [14]. При ХБП левофлоксацин назначают по 500 мг 1 раз в сутки, а офлоксацин и ципрофлоксацин следует принимать по 400 мг 2 раза и по 500 мг 2 раза в сутки соответственно в течение 3—4 недель. Доксициклина моногидрат, а также азитромицин и джозамицин рекомендуются в качестве альтернативных лекарственных средств. Антимикробные препараты для лечения ХБП, а также

способы их применения приведены в табл. 3.

С момента появления на мировом рынке фторхинолоны довольно быстро стали особо актуальными антимикробными препаратами для терапии ХБП. Механизм антибактериального действия фторхинолонов заключается в ингибировании ферментов, ответственных за изменения пространственной конфигурации бактериальной ДНК: ДНК-гиразы и топоизомеразы IV. ДНК-гираза осуществляет суперспирализацию бактериальной ДНК, а топоизомераза IV — разделение дочерних хромосом в процессе репликации. Ключевым моментом в действии фторхинолонов является образование трёхкомпонентного комплекса (бактериальная ДНК-фермент — фторхинолон). Указанный комплекс предотвращает репликацию бактериальной ДНК. Благодаря тому что топоизомеразы обладают расщепляющей активностью, происходит разрушение молекулы ДНК [15]. После перорального приёма фторхинолонов в ткани и секрете предстательной железы создаются концентрации препаратов, значительно превышающие величины МПК в отношении большинства бактериальных возбудителей ХП. За счёт этого обеспечивается эрадикация уропатогенов. При этом клиническая эффективность терапии фторхинолонами в большинстве случаев коррелирует с эрадикацией возбудителя. Антимикробные препараты из группы фторхинолонов III поколения проявляют активность как в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, так и атипичных внутриклеточных микроорганизмов, а также способны воздействовать на бактерии в биологических плёнках.

Левифлоксацин в лечении ХБП

Левифлоксацин применяется в клинической практике с 1993 г., после крупномасштабных кли-

Таблица 4. Антимикробная активность *in vitro* левофлоксацина (МПК₉₀, мкг/мл) [17]

Микроорганизмы	Левофлоксацин
<i>Acinetobacter</i> spp.	16,0
<i>Citrobacter freundii</i>	0,5
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,5
<i>Escherichia coli</i>	0,12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,25
<i>Proteus mirabilis</i>	0,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	16,0

Таблица 5. Фармакокинетические параметры левофлоксацина при приёме разовой дозы 500 мг [18]

Максимальная концентрация в плазме, мкг/мл	5,2
Время достижения максимальной концентрации в плазме, часы	1,3
Площадь под фармакокинетической кривой, мкг/мл • ч	42,6
Период полувыведения, часы	7,4
Почечный клиренс, мл/мин	125,5
Биодоступность, %	99

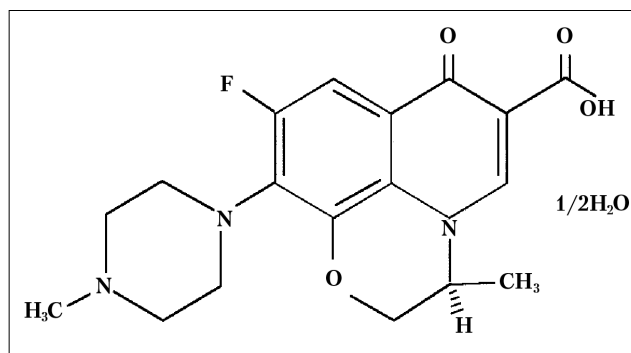
нических испытаний. По химическому строению левофлоксацин является фторхинолоном III поколения и представляет собой оптически активный левовращающий изомер офлоксацина-S-метил-энантиомер рацемической смеси офлоксацина (рисунок).

4-метил-пиперазинильная группа в химической структуре левофлоксацина обуславливает усиление всасывания при пероральном приёме препарата, повышение активности в отношении грамотрицательных бактерий и удлинение периода полувыведения. Оксазиновое кольцо в молекуле данного препарата обеспечивает расширение спектра активности в отношении грамположительных бактерий, а также удлинение периода полувыведения.

Левофлоксацин является фторхинолоном, обладающим более высокой активностью по сравнению с фторхинолонами предыдущих поколений в отношении грамположительных бактерий и атипичных внутриклеточных микроорганизмов, а также сохраняющим высокую активность в отношении грамотрицательных бактерий [16]. Антимикробную активность *in vitro* левофлоксацина — препарата из фторхинолонов III поколения, имеющего регистрацию для лечения ХБП, демонстрирует табл. 4.

Левофлоксацин обладает рядом достоинств, в их числе — широкий спектр действия, благоприятные фармакокинетические свойства, хорошая переносимость. Необходимо отметить, что препарат создает эффективные концентрации в моче, ткани и секрете предстательной железы. Фармакокинетические параметры левофлоксацина демонстрирует табл. 5.

Необходимо отметить, что эффективность и безопасность левофлоксацина при лечении ХБП была подтверждена многочисленными клиническими исследованиями. По данным К. Suzuki с со-

**Химическая структура левофлоксацина**

авт., клиническая эффективность левофлоксацина (по 300—400 мг в сутки в течение 7—14 дней) при лечении 29 больных ХП и 3 больных с хроническим эпидидимитом составила при ХБП — 100%, а при хроническом абактериальном простатите — 66,7%. Микробиологическая эффективность терапии у больных с ХБП составила 83,3%, при хроническом абактериальном простатите — 74,1% [19].

При проведении многоцентрового двойного слепого исследования в США сравнивали эффективность четырёхнедельного применения левофлоксацина (по 500 мг 1 раз в сутки) с цiproфлоксацином (по 500 мг 2 раза в сутки) при лечении 377 больных ХБП, обусловленным преимущественно грамположительной флорой. Клиническая эффективность терапии левофлоксацином составила 75%, а цiproфлоксацином — 72,8%. Микробиологическая эффективность левофлоксацина и цiproфлоксацина была получена в 75 и 76,9% соответственно [20]. При проведении дальнейших исследований, была продемонстрирована улучшенная фармакокинетика левофлоксацина в отношении создания более высоких концентраций в секрете предста-

тельной железы по сравнению с ципрофлоксацином, что способствовало его успешному применению при ХБП.

По данным S. Guercio с соавт., применение левофлоксацина по 500 мг в сутки в течение 20 дней у больных ХП с повышенным уровнем простатспецифического антигена приводит к его снижению и уменьшает число отрицательных результатов гистологического исследования, то есть позволяет отказаться от ненужных биопсий предстательной железы [21].

Эффективность и безопасность левофлоксацина в терапии 117 больных ХБП была в очередной раз подтверждена многоцентровым исследованием, проведённым в 8 странах Европы. Грамотрицательные бактерии были выделены у 57, грамположительные — у 60 больных. Клиническая эффективность лечения левофлоксацином в дозе 500 мг 1 раз в сутки в течение 28 дней оказалась 77,4% через 1 месяц и 61,9% через 6 месяцев после лечения. Эрадикацию возбудителя зарегистрировали в 83,7% через 1 месяц и в 91,2% случаях спустя 6 месяцев после лечения [22].

Результаты проведённых в России и странах ближнего зарубежья клинических исследований также подтверждают эффективность и безопасность левофлоксацина при лечении ХБП. В клиническом исследовании левофлоксацин в комплексе с иммуномодуляторами, ферментами и физиотерапией назначали 58 больным хроническим простатитом в дозе 500 мг 1 раз в сутки в течение 15 дней. При этом эффективность такой терапии составила 91,6%, при низком (5,2%) уровне побочных реакций [23]. У 20 больных ХБП в возрасте от 22 до 49 лет (средний возраст — 35,7 лет), принимавших участие в исследовании эффективности и безопасности левофлоксацина по 500 мг 1 раз в сутки в течение 28 дней, проведённом урологической клиникой РГМУ, длительность заболевания ХП составляла от 2 до 20 лет (в среднем — 4,9 лет). При итоговой клинической оценке эффективности антимикробной терапии левофлоксацином оказалось, что выздоровления удалось достигнуть у 5 (25%), улучшения состояния — у 15 (75%) больных ХБП. По данным итоговой бактериологической оценки эффективности терапии, эрадикация

возбудителя отмечена у 12 (60%), колонизация у 6 (30%), персистенция у 2 (10%) больных. Аллергических реакций и других нежелательных явлений у пациентов за всё время исследования не отмечено [24]. Опыт и опубликованные результаты исследований клиники урологии МГМСУ позволяют считать назначение левофлоксацина высокоэффективным методом профилактики бактериального простатита при трансректальной биопсии простаты [25]. В недавнем исследовании, проведённом в клинике урологии 1 МГМУ им. И. М. Сеченова, эффективность левофлоксацина исследовали у 96 больных ХБП. Оценку эффективности препарата проводили через 2 и 4 недели после начала терапии. Клиническая эффективность данного препарата составила 85,4%, а микробиологическая — 89,6% [26].

В целом, левофлоксацин хорошо переносится больными. В обзоре, анализирующем 28 клинических фармакологических исследований, 19 исследований в рамках III фазы клинического изучения и постмаркетингового применения в последние 6 лет (более 100 млн предписаний), отмечается, что в исследованиях, проведённых перед началом передачи препарата в клинику, наиболее частыми побочными реакциями при применении левофлоксацина и препаратов сравнения являются тошнота (4,9 и 4,8% соответственно), диарея (4,5 и 7,9%) и головная боль (4,1 и 4,5%) [27].

Заключение

На сегодняшний день левофлоксацин, фторхинолон III поколения, относящийся к антимикробным препаратам широкого спектра действия, является эффективным лекарственным средством терапии ХБП. Несомненные достоинства препарата, такие как пролонгированное действие, способность проникать через гематопростатический барьер и создавать эффективные концентрации в ткани и секрете предстательной железы, а также воздействовать на грамположительные и грамотрицательные бактерии, удобный режим дозирования и хорошая переносимость, обуславливают возможность дальнейшего успешного применения левофлоксацина при лечении ХБП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Практическая урология. / Под ред. П. В. Глыбочко, Ю. Г. Аляева М.: ИД «Медфорум», 2012; 352.
2. Аполихин О.И., Абдуллин И.И., Сивков А.В., Ощепков В.Н., Егоров А.А. Хронический простатит. Пленум правления Российского Общества Урологов, Саратов: М.: 2004; 5—12.
3. Лоран О.Б., Велиев Е.И., Живов А.В. Хронический простатит — одна болезнь? Урология 2009; 1: 70—75.
4. Дорофеев С.Д., Камалов А.А. Современные взгляды на проблему хронического простатита. РМЖ 2003; 11: 4: 736—742.
5. Naber K.G. Antimicrobial treatment of bacterial prostatitis. Eur Urol Suppl 2003; 2: 23—25.

6. Мазо Е.Б., Попов С.В. Хронический бактериальный простатит. Руководство для врачей «Иммунотерапия» /Под ред. Р. М. Хаитова, Р. И. Атауллаханова. М.: ГЭОТАР, 2011; 290—298.
7. Трапезникова М.Ф., Савицкая К.И., Нестерова М.В. Мониторинг возбудителей хронического бактериального простатита. Пленум правления Российского Общества Урологов, Саратов: М.: 2004; 366—367.
8. Калинина С.Н., Александров В.П., Тиктинский О.Л. Этиологические и эпидемиологические особенности простатитов, везикулитов, эпидидимитов, обусловленных урогенитальной скрытой инфекцией и осложнённых нарушением половой функции. Всероссийская конференция «Мужское здоровье», М.: 2003; 66—67.
9. Неймарк А.И., Алиев Р.Т., Неймарк Б.А., Юрова В.А. Характеристики грамположительных микроорганизмов, выделенных при хро-

- ническом бактериальном простатите. Журн микробиол эпидемиол иммунобиол 2010; 5: 73—77.
10. Коган М.И., Ибишев Х.С., Набока Ю.Л. Этиологическая структура и антибиотикочувствительность микроорганизмов, выделенных при хроническом бактериальном простатите. Consilium medicum 2010; 7: 5—7.
 11. Luzzi G. The prostatitis syndromes. Int STD and AIDS 1996; 7: 471—478.
 12. Локишин К. Л. Простатиты / Под ред. Ю. Г. Аляева. М.: «Планида», 2011; 24.
 13. Перепанова Т.С. Современное ведение пациентов с хроническим простатитом. Фарматека. 2008; 9: 21—26.
 14. Антимикробная терапия и профилактика инфекций почек, мочевыводящих путей и мужских половых органов. Российские национальные рекомендации / Под ред. Н. А. Лопаткина, О. И. Аполихина, Д. Ю. Пушкаря, А. А. Камалова, Т. С. Перепановой. М.: 2013; 64.
 15. Сидоренко С. В. Микробиологическая характеристика инфекций мочевыводящих путей у амбулаторных больных», М.: 1999; 9—14.
 16. Яковлев С. В., Яковлев В. П. Левофлоксацин — новый антимикробный препарат группы фторхинолонов. М.: Дипак, 2006; 240.
 17. Деревянко И. И., Нефедова Л. А. Применение новых фторхинолонов в урологии. Урология 2004; 4: 27—32.
 18. Naber K. G., Morrissey I., Ambler J. E. Urinary Tract Infections and Fluoroquinolones. Science Press Ltd, 2000.
 19. Suzuki K., Horiba M. Clinical study of levofloxacin (DR-3355) on urogenital infections — with special reference to usefulness for chronic prostatitis. Acta Urol.Jap 1992; 38: 6: 737—743.
 20. Bundrick W., Heron S.P., Ray P. et al. Levofloxacin versus ciprofloxacin in the treatment of chronic bacterial prostatitis: a randomized double-blind multicenter study. Urology 2003; 62: 3: 537—541.
 21. Guercio S., Terrone C., Tarabuzzi R. et al. PSA decrease after levofloxacin therapy in patients with histological prostatitis. Arch Ital Urol Androl 2004; 76: 4: 154—158.
 22. Naber K. G., Roscher K., Botto H., Schaefer V. Oral levofloxacin 500 mg once daily in the treatment of chronic bacterial prostatitis. Int J Antimicrob Agents 2008; 32: 145—153.
 23. Гурженко Ю. Н. Использование препарата Таваник (левофлоксацин) у больных хроническим простатитом. Здоровье мужчины 2004; 3: 81—86.
 24. Попов С. В., Мазо Е. Б. Этиотропная терапия хронического бактериального простатита. Урология 2008; 3: 36—41.
 25. Пушкарь Д. Ю., Зайцев А. В., Раснер П. И. Антимикробная профилактика и лечение бактериального простатита: сохраняющаяся роль фторхинолонов. Consilium med 2009; 7: 46—49.
 26. Аляев Ю. Г., Шноть Е. В., Султанова Е. А. Применение левофлоксацина (Лефокцина) при хроническом простатите. РМЖ 2011; 16: 1018—1023.
 27. Harding I., Simpson I. et al. In: Abstracts of 7th Intern. Symposium on New Quinolones, Edinburg, 2001. J Antimicrob Chemother 2001; 47: Suppl 1: Abstr P. 133.

Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистома, её объём, разнообразие и развитие

К. А. ВИНОГРАДОВА, В. Г. БУЛГАКОВА, А. Н. ПОЛИН, П. А. КОЖЕВИН

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Microbial Antibiotic Resistance: Resistome, Its Volume, Diversity and Development

K. A. VINOGRADOVA, V. G. BULGAKOVA, A. N. POLIN, P. A. KOZHEVIN

M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Рассмотрены существующие представления о резистоме как совокупности всех генов резистентности к антибиотикам в геномах всех микроорганизмов — патогенных и непатогенных, живущих в природных условиях. Приведены сведения, касающиеся происхождения, эволюции и распространения генов устойчивости к антибиотикам, а также возможных подходов к контролю распространения устойчивости.

Ключевые слова: микроорганизмы, геном, резистома.

The known conceptions of resistome as a complex of all the antibiotic resistance genes in the genomes of all the microorganisms, pathogenic and nonpathogenic ones, in nature are considered. The data on the origin, evolution and distribution of antibiotic resistance genes and possible approaches to the resistance distribution control are presented.

Key words: microorganisms, genome, resistome.

Важнейшей проблемой медицинского или любого другого использования антибиотиков является возможность и практически даже неотвратимость возникновения устойчивости ко всем классам этих веществ. Особенную опасность представляет наблюдаемое в последние десятилетия возникновение и быстрое распространение патогенных микроорганизмов, обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам. В среде медицинской общественности появилось предупреждение о том, что «устойчивость к противомикробным препаратам является серьёзной проблемой, которая подрывает усилия по борьбе с инфекционными болезнями и потенциально может остановить прогресс, а, возможно, даже и обратить его вспять» (<http://www.apтекаexpo.ru/news/industry-news>).

В последнее время большое внимание уделяется изучению устойчивости к антибиотикам тех микроорганизмов, которые обитают в окружающей нас среде. Проблема существования в природе устойчивости к антибиотикам приобретает особое значение, в частности, на фоне понимания нерезультативности того пути борьбы с устойчивостью, который состоял в поисках и от-

крытии всё новых и новых антимикробных препаратов, или в их так называемом «рациональном применении», малая эффективность которого стала очевидной к настоящему времени. Возникновение, поддержание и распространение устойчивости у микроорганизмов, обитающих в окружающей среде, а не только в условиях клиники, интенсивно изучаются в настоящее время в связи с высокой теоретической и практической значимостью этих проблем.

В данном обзоре рассматривается понятие глобальной резистомы, отражающее новое понимание масштабов устойчивости микроорганизмов к антибиотикам в условиях клиники и в окружающей среде, а также отмечается разнообразие функциональных ролей генов устойчивости к антибиотикам. Обсуждаются имеющиеся взгляды на происхождение устойчивости микроорганизмов к антибиотикам и на некоторые аспекты контроля за её распространением.

Понятие о резистоме

С началом широкого практического использования антибиотиков в течение долгого времени преимущественно исследовались механизмы устойчивости и гены антибиотикоустойчивости у патогенных бактерий, циркулирующих в клинике. Однако в последние годы получены многочисленные сведения о том, что микроорганизмы,

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12. МГУ им. М. В. Ломоносова. Биологический факультет

живущие в природных местах обитания, а не только в клинических условиях, несут разнообразные гены устойчивости к антибиотикам, причём как давно применяемым в медицине, так и введённым в практику совсем недавно. В последнее время направление исследований от изучения устойчивости патогенных микроорганизмов закономерно перешло к исследованиям устойчивости микроорганизмов, обитающих в окружающей среде [1–6].

В научную литературу было введено понятие глобальной резистомы как совокупности всех генов резистентности к антибиотикам в геномах всех микроорганизмов — патогенных и непатогенных, живущих в природных условиях в самых разнообразных биотопах [1]. В составе резистомы было предложено рассматривать также и так называемые потенциальные гены устойчивости — гены, кодирующие белки, определяющие умеренную антибиотикоустойчивость, или гены, обеспечивающие аффинность к антибиотикам [7].

По-видимому первым исследованием, целенаправленно посвящённым распространению устойчивости к антибиотикам среди микроорганизмов — обитателей почвы, было изучение устойчивости коллекции из 480 аборигенных стрептомицетов, выделенных из образцов различных почв (городских, сельскохозяйственных, лесных), по отношению к 21 антимикробному препарату [1]. Испытанные препараты относятся к разным классам химических веществ, среди них антибиотики микробного происхождения, их полусинтетические производные и синтетические препараты. Все они обладают различными механизмами действия на бактерии, причём одни препараты широко используются в течение десятков лет, другие — введены в практику относительно недавно. Оказалось, что все изученные почвенные стрептомицеты проявляют устойчивость хотя бы к одному из испытанных препаратов, независимо от времени его открытия или механизма действия. Подавляющее число стрептомицетов устойчиво к 6–8 препаратам, а два показали устойчивость к 21 препарату. Спектры устойчивости аборигенных стрептомицетов очень разнообразны — обнаружено около 200 различающихся профилей устойчивости. Среди почвенных стрептомицетов выявлены в том числе устойчивые по отношению и к синтетическим препаратам, например, к ципрофлоксацину. Почти все стрептомицеты показали наличие устойчивости к липопептидному антибиотику даптомицину, относительно недавно проанонсированному как эффективный препарат против грамположительных патогенных бактерий, обладающих множественной антибиотикоустойчивостью.

Таким образом, на большом материале было показано, что типичные обитатели почв — стреп-

томицеты обладают разнообразными механизмами устойчивости ко многим антимикробным препаратам, причём некоторые почвенные стрептомицеты показали множественную устойчивость. Устойчивость к антибиотикам не зависит от того, является ли сам данный стрептомицет продуцентом антибиотика или нет. У почвенных стрептомицетов были обнаружены гены устойчивости, неизвестные ранее для клинических патогенных микроорганизмов. Авторы указывают на то, что изученные ими стрептомицеты являются лишь небольшой частью почвенного микробного сообщества, и настоящий объём устойчивости к антибиотикам, которым обладают природные микробные сообщества, во много раз превышает исследованный. Важнейшим выводом является утверждение о том, что объём устойчивости к антибиотикам, который несёт в себе почвенная микробиота, ранее был недооценен, и что вся совокупность генов устойчивости к антибиотикам патогенных микроорганизмов также является лишь частью глобальной резистомы [5, 7, 8].

Для выявления генов устойчивости в микробных сообществах, обитающих в самых разных экологических нишах, в настоящее время часто используются достижения метагеномного анализа [9–12]. Этот подход дает возможность учесть весь пул генов устойчивости к определённому антибиотику в данном микробном сообществе, где, в том числе, присутствуют и некультивируемые микроорганизмы, по разным данным составляющие до 99% микробного сообщества. Кроме того, при этом остаются в стороне сложности выделения различных таксономических групп микроорганизмов из природных субстратов. В одной из таких работ в образцах почв, взятых под дубами на территории сельскохозяйственной исследовательской станции США, где никогда не применялись антибиотики, обнаружены гены устойчивости к аминогликозидам и к тетрациклинам. Эти гены характеризуются значительной дивергенцией по отношению к генам, описанным ранее (сходство менее 60%). Авторы подчеркнули, что набор генов устойчивости к антибиотикам почвенного микробного сообщества очень разнообразен, и при этом почвенные некультивируемые микроорганизмы являются богатым природным резервуаром неизвестных ранее генов устойчивости [9].

Интенсивными исследованиями последних лет гены устойчивости к антибиотикам обнаружены в самых разных природных биотопах, в разнообразных экологических нишах, находящихся в различных почвенно-климатических зонах [1, 13–19].

Особый интерес представляют исследования, свидетельствующие о присутствии устойчивых к антибиотикам микроорганизмов в тех природных биотопах, которые в силу разных обстоятельств

не подвергались никакому антропогенному вмешательству. Это относится к микробным сообществам в целинных биотопах, длительно существующим в изоляции от антропогенного влияния, а также к микробным сообществам очень древним, сформировавшимся за сотни лет до «эры антибиотиков». Еще в 1991 году было сказано: «Очень интересно то, что бактерии из тел, замороженных 140 лет тому назад, оказались устойчивыми к тем антибиотикам, которые были открыты на 100 лет позднее. Таким образом, в бактериях существует специфическая химическая потребность в устойчивости» [20].

Гены устойчивости к антибиотикам содержатся в таком высокоспецифическом биотопе как морские глубоководные донные осадки, через которые происходит просачивание снизу тока воды, обогащённой сероводородом, углеводородами (метаном и др.) («cold-seep sediments»). Возраст изученных осадков, находящихся на глубине 1450 метров, — 10000 лет. В них были выявлены β -лактамазы TEM-1, обеспечивающие устойчивость к ампициллину, пиперациллину и цефалотину, и β -лактамазы TEM-116, обеспечивающие устойчивость к цефтазидиму, цефотаксиму и азтреонаму. По ряду свойств они не отличались от β -лактамаз современных клинических изолятов [14]. Более двух третей представителей Enterobacteriaceae, выделенных из вод чистых пресных высокогорных озёр, обладают множественной устойчивостью к антибиотикам, причём наиболее часто отмечалась устойчивость к β -лактамам и хлорамфениколу [21].

Особый интерес представляют древние микробные сообщества из многолетнемёрзлых отложений в Восточной Сибири — в их составе обнаружены грамположительные и грамотрицательные бактерии, резистентные к аминогликозидам, хлорамфениколу и тетрациклину [22]. Некоторые древние бактерии обладают множественной устойчивостью к изученным антибиотикам. Возраст исследованных образцов, взятых с глубин от 2 до 40 метров, составляет от 3 тысяч до 3 миллионов лет. Авторы отметили, что более древние (220—290 тысяч лет) почвенные микробные сообщества содержат больше устойчивых к стрептомицину и хлорамфениколу бактерий по сравнению с более «молодыми» сообществами (15—40 тысяч лет) [22].

В сообществе почвенных бактерий, выделенных из почвенных образцов с глубин 170—259 метров, 90% бактерий устойчивы хотя бы к одному из 13 испытанных антибиотиков, и более половины обладают множественной устойчивостью [23]. В аборигенных бактериях, живущих на глубинах от 170 до 210 метров, была обнаружена новая детерминанта устойчивости к тетрациклину — Tet 42. Авторы подчеркивают, что в данном случае устойчивые бактерии выделены из почвенных об-

разцов, бывших в изоляции от поверхностных слоев почвы в течение почти 3 миллионов лет и никогда не контактировавших ни с коммерческими антибиотиками, ни с какими-либо бактериями, несущими гены устойчивости к тетрациклину [24].

Сама специфика подобных местообитаний свидетельствует в пользу того, что устойчивость к антибиотикам является свойством, присущим живущим в них микроорганизмам, а не возникла как приобретённая в результате селективного давления различных антибиотиков, «загрязнивших» этот биотоп в «эру антибиотиков».

Одним из свидетельств наличия у микроорганизмов, обитающих в окружающей среде, присущей им устойчивости к антибиотикам является следующее исследование [18]. Авторы изучили устойчивость аборигенных микроорганизмов по отношению к 10 антимикробным препаратам, а также содержание генов устойчивости к β -лактамам в микробных сообществах трёх пресноводных олиготрофных озёр, подвергающихся антропогенному воздействию разной степени. Большинство из 272 аборигенных бактерий проявляют устойчивость по крайней мере к одному из 10 изученных препаратов, а многие бактерии обладают множественной устойчивостью. Интересно то, что распространённость устойчивых бактерий в данных биотопах не коррелирует со степенью антропогенного давления на них [18].

Известно, что интенсивное распространение антибиотикоустойчивости в окружающей среде связано с широким применением антибиотиков в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и др. отраслях. В настоящее время большое внимание уделяется вопросам возникновения и распространения устойчивости к антибиотикам в местах обитаниях, ассоциированных с сельскохозяйственной или промышленной деятельностью человека, ввиду многих практически важных аспектов этой проблемы, включая и безопасность пищевых продуктов [25]. В разных странах проводятся широкие исследования, посвящённые выявлению устойчивости к антибиотикам в организме сельскохозяйственных животных и птиц, а также и в продуктах питания, получаемых на сельскохозяйственных фермах, где используются антибиотики. Многократно отмечена связь между применением антибиотиков для лечения сельскохозяйственных животных и птиц или улучшения их кондиций и обнаружением устойчивых микроорганизмов и в организме животных и птиц, и в пищевой продукции [5, 25—27].

Применение антибиотиков в сельском хозяйстве изменяет состав и функциональные свойства микрофлоры в природных местах обитания (почвы, подземные воды) в сторону увеличения антибиотикоустойчивости микробного сообщества. Внесение

в почву органического удобрения, получаемого со свиноферм, где используется тетрациклин, резко увеличивает устойчивость данного микробного сообщества к этому антибиотику [28, 29]. Многими исследованиями доказано существенное увеличение уровня устойчивости к антибиотикам в местности, где расположены сельскохозяйственные фермы, использующие антибиотики для обработки животных и птицы [25]. В серии работ в течение ряда лет исследовалась динамика устойчивости к тетрациклину в ландшафте с сельскохозяйственными фермами, в которых при содержании животных использовался этот антибиотик [30, 31]. Устойчивость к тетрациклину была обнаружена не только на фермах (в кишечном тракте животных, в специальных отстойниках), но и в грунтовых водах, и в колодцах с питьевой водой в данной местности.

Таким образом, к настоящему времени получены убедительные и достаточные доказательства того, что микроорганизмы, живущие в окружающей среде, несут большое число разнообразных генов устойчивости к антибиотикам, причём в их числе постоянно выявляются гены, неизвестные ранее для патогенных микроорганизмов. Вопрос о том, что природные места обитания микроорганизмов, окружающая нас среда являются богатым резервуаром разнообразной антибиотикоустойчивости, можно считать решённым окончательно.

Возникновение и распространение антибиотикоустойчивости

Молекулярно-генетическая природа устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, возникновение и распространение генов устойчивости, мобильные генетические элементы и их роль в передаче и распространении устойчивости, мозаичная структура геномов современных видов бактерий, а также эволюция антибиотикоустойчивости интенсивно изучаются [7, 10, 32–37].

По мере формирования путей биосинтеза антибиотиков — соединений, необходимых для функций защиты, конкуренции, сигнальных целей, формировалась система защиты продуцентов от собственных антибиотиков на геномном и, соответственно, белковом (ферментном) уровне — для этого стали использоваться белки-ферменты с различными метаболическими и другими функциями. В результате эволюционирования генов, кодирующих белки с этими функциями, возникла система ферментов, обеспечивающая устойчивость продуцентов к антибиотикам.

Имеются доказательства возможности реального осуществления «защитной функции» антибиотиками в окружающей среде (в частности, в почве). Например, способность стрептомицетов-продуцентов синтезировать в почве антибиотики, которые накапливаются и сохраняются в почвен-

ных микроразонах в течение определённого времени, показана на примере люминесцирующего антибиотика гелиомицина [38]. Известные факты эффективного применения стрептомицетов — продуцентов антибиотиков в качестве биофунгицидов свидетельствуют в пользу того, что антибиотики могут синтезироваться своими продуцентами в окружающей среде в концентрациях, достаточных для подавления других микроорганизмов *in situ* [39, 40]. В этих случаях гены устойчивости к антибиотикам, очевидно, выполняют свою прямую функцию «защиты».

Необходимость возникновения генов устойчивости к собственному антибиотику у продуцентов очевидна, но в природных условиях и непродуцирующие антибиотики бактерии обладают генами устойчивости. В настоящее время все концепции, касающиеся источников, происхождения и эволюции генов резистентности, включают представление о том, что наличие генов устойчивости или их гомологов является естественным состоянием микроорганизмов, обитающих в окружающей среде, и что роль этих генов в жизнедеятельности клетки во многих случаях шире, чем только обеспечение антибиотикоустойчивости. Огромный объём и разнообразие резистомы, наличие генов устойчивости к антибиотикам у непродуцирующих антибиотиков микроорганизмов, даёт основание рассматривать возможность других функций генов антибиотикоустойчивости помимо защитной.

Общепризнанно представление о том, что продуценты антибиотиков могут являться источником детерминант устойчивости для других микроорганизмов [41], осуществляя передачу генов путем горизонтального переноса. Однако процесс возникновения генов устойчивости в микробиоте носит более сложный характер. Предполагается, что детерминанты устойчивости произошли от белков с метаболическими функциями, близкими или аналогичными по характеру биохимических реакций к механизмам, определяющим устойчивость [4, 7, 32, 33, 35, 36].

Имеются свидетельства того, что некоторые гены устойчивости продуцентов и устойчивых бактерий произошли от общих генов-предшественников, существовавших уже миллионы лет, задолго до начала использования антибиотиков [7, 10, 33, 35, 36]. Кодируемые ими метаболические белки-предшественники могли иметь свойства, дающие определённую степень устойчивости к антибиотикам или способность связывать эти вещества [7]. Гены, первично участвовавшие в метаболизме, в процессе эволюционной диверсификации и селективного давления антибиотиков начинали определять устойчивость.

Гипотеза о том, что гены устойчивости обладают функциями, отличными от функции защи-

ты от антибиотиков [42] получила широкую поддержку и экспериментальное подтверждение.

Уже в 80-х годах было высказано предположение о том, что устойчивость продуцентов к аминогликозидам определяется генами, происходящими от хромосомных метаболитических генов, а ферменты продуцентов, модифицирующие аминогликозиды, могут осуществлять функции, не связанные с инактивацией антибиотиков [42]. В дальнейшем анализ структуры бактериальных N-ацетилтрансфераз и фосфотрансфераз, модифицирующих аминогликозиды, обнаружил значительный уровень гомологии этих белков с ферментами, осуществляющими ацетилирование и фосфорилирование в метаболитических процессах микроорганизмов и эукариотов; показана гомология генов, определяющих модификацию аминогликозидов, и хромосомных генов бактерий, в том числе не обладающих устойчивостью к этим антибиотикам [7, 33, 43, 44].

Предполагается, что устойчивость к аминогликозидам может являться результатом мутаций, резко повышающих экспрессию генов, гомологичных генам ферментов, модифицирующих аминогликозиды, может также изменяться регуляция генов [45]. На основании ряда исследований показана возможность происхождения аминогликозидацетилтрансферазы из белка-предшественника с киназной активностью [43, 44, 46].

Показана возможность участия генов, кодирующих аминогликозидтрансферазы, в метаболитических процессах микобактерий, лактококков, энтерококков, *Pseudomonas aeruginosa* [47]. Экспрессия хромосомного гена *Providencia stuartii*, кодирующего 2'-N-ацетилтрансферазу и определяющего устойчивость к гентамицину, прямо влияет на морфологию клеток. Фермент участвует в клеточном метаболизме, осуществляя O-ацетилирование пептидогликана, и играет существенную роль в сохранении структуры клеточной стенки [48].

Широко распространенные ферменты β -лактамазы, инактивирующие антибиотики β -лактамы, по-видимому, произошли от транспептидаз — пенициллинсвязывающих белков (ПСБ). Эти ферменты участвуют в синтезе клеточной стенки, осуществляя транспептидазную реакцию — перенос пептидов с концевыми D-ala-D-ala на растущую цепь пептидогликана. Эволюционная связь β -лактамаз и ПСБ подтверждена данными структурного анализа ферментов и секвенирования генов [49–51].

Ген, локализованный в хромосоме различных представителей рода *Kluyvera*, кодирующий β -лактамазу, практически идентичен генам этих ферментов у других групп бактерий. Предполагается, что β -лактамаза *Kluyvera* — эволюционный предшественник группы бактериальных β -лактамаз с широким спектром действия [52].

Распространённость β -лактамаз в геномах бактерий и сходство структуры этих ферментов с транспептидазами свидетельствует о том, что β -лактамазы не только обеспечивают устойчивость к β -лактамам, но и участвуют в формировании и сохранении структуры клеточных стенок [50]. Группа металло- β -лактамаз участвует во многих биологических процессах, в том числе в процессинге РНК, репарации ДНК и др. [53].

В ряде случаев необходимость обеспечивать прежде всего устойчивость к антибиотикам вызвала модификацию метаболитических генов и кодируемых ими ферментов, позволяющую более эффективно осуществлять функцию «защиты».

В процессе эволюции и селективного давления антибиотиков возникло определённое дистанцирование β -лактамаз от транспептидаз — задача обеспечения устойчивости к антибиотикам в среде обитания успешнее решалась ферментом, не связанным с пептидогликаном. Произошла структурная модификация β -лактамаз, препятствующая взаимодействию фермента с субстратом ПСБ — пептидогликаном [49–51].

Наиболее очевидным является многофункциональный характер систем активного выброса (эффлюкса) веществ из бактериальных клеток. Все микроорганизмы обладают хромосомными генами, кодирующими системы эффлюкса — помпы [54, 55]. Показана возможность множественности помп в геноме одного микроорганизма, например, геном обладающего множественной устойчивостью штамма *Pseudomonas aeruginosa* содержит более 20 систем эффлюкса [56].

Помпы обеспечивают удаление из клеток токсичных промежуточных продуктов метаболизма и устойчивость к внешним токсинам [4, 32, 55]. Системы эффлюкса участвуют в биосинтезе макромолекул, в колонизации и персистировании бактерий в хозяине, в межклеточном сигнальном трафике, также показана связь между экспрессией генов эффлюкса и системой кворум-сенсинга [57, 55]. Сверхсинтез детерминант, определяющих эффлюкс, снижает вирулентность культур *P.aeruginosa* и *Stenotrophomonas maltophilia* [58].

Функционирование помп в качестве непосредственного фактора резистентности имеет большое значение для микроорганизмов — продуцентов антибиотических веществ. Как механизм защиты продуцентов от собственного антибиотика системы экспорта образующегося вещества в среду играют важнейшую роль. Для тех продуцентов, у которых не образуются инактивирующие антибиотик ферменты, а мишени действия антибиотика сохраняют чувствительность в период биосинтеза, активный эффлюкс имеет первостепенное значение [59].

Эффлюкс может обеспечивать устойчивость бактерий к одному или нескольким структурно

близким антибиотикам, множественная лекарственная устойчивость целиком определяется системой выброса веществ из клеток [32, 54].

Один из примеров развития у бактерий антибиотикоустойчивости с использованием метаболических генов — устойчивость к хинолонам. Хинолоны — синтетические вещества, не образующиеся почвенными микроорганизмами, не имеющие природных аналогов и, кроме того, сравнительно недавно введенные в медицинскую практику. Однако устойчивость к хинолонам широко распространена среди различных групп микроорганизмов как в естественных условиях обитания, так и среди патогенов. Все обладающие множественной лекарственной устойчивостью бактерии устойчивы к этим веществам [55, 60, 61].

Экспрессия генов системы эффлюкса — один из двух основных механизмов резистентности к хинолонам [62–64]. Способность к активному выбросу хинолонов показана как для клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa*, так и для штаммов, выделенных из почв [62].

Другой механизм устойчивости к хинолонам обеспечивается хромосомной мутацией, ведущей к снижению аффинности к хинолонам ферментов ДНК-гиразы и топоизомеразы IV, мишеней действия этих соединений. Устойчивость определяется генами типа *qnr*, кодирующими белок Qnr из группы пентапептидов. Белок Qnr взаимодействует с гиразой на ранних стадиях образования комплекса ДНК-гираза, снижая связывание фермента с ДНК, уменьшая количество сайтов действия хинолона [65].

Ген *qnr* обнаруживается как у патогенов, так и у природных бактерий [61, 66, 67]. Кроме генов *qnr*, природные бактерии обладают генами, кодирующими пентапептидные белки, гомологичные Qnr [66, 67]. Выделенный из *Mycobacterium tuberculosis* белок пентапептидной группы MfrA по ряду свойств очень близок к ДНК [68], возможно, фермент, вовлеченный в метаболизм ДНК у природных бактерий, способен оказывать защитное действие в отношении синтетического антибиотика. По-видимому, гены, кодирующие белки из группы пентапептидов, осуществляли в природе функции, связанные с метаболизмом ДНК. Присутствие антибиотика вызвало диверсификацию генов и появление защитной функции. Кроме того, в природной микробиоте распространены соединения, аналогичные хинолонам по структуре и участвующие в кворум-сенсинге и сигнальном трафике [69].

Процесс возникновения у микроорганизмов генов устойчивости от собственных (house-keeping) генов, обладающих иными функциями, продолжается в связи со всё возрастающим использованием антибиотиков в медицине и различных отраслях хозяйственной деятельности. Однако

есть доказательства того, что огромное количество генов, определяющих устойчивость, возникло задолго до начала использования антибиотиков.

Исследования последних лет показали, что гены устойчивости к антибиотикам находились в популяциях микроорганизмов, обитающих в природных условиях, за сотни миллионов лет до появления антибиотиков. О древности происхождения генов устойчивости свидетельствует высокий уровень дивергенции между генами продуцентов антибиотиков (предположительно наиболее древних генов) и генами устойчивости у клинических изолятов [33, 36].

Данные филогенетического анализа, основанного на исследовании структуры генов кластеров родственных генов, также доказывают древнее происхождение генов антибиотикоустойчивости [10]. Кластеры генов биосинтеза эритромицина, стрептомицина, ванкомицина и, следовательно, генов устойчивости к этим веществам возникли многие миллионы лет назад [70], сериновые β -лактамазы появились более двух миллиардов лет назад, еще до разделения бактерий на грамположительные и грамотрицательные [71, 72].

Историю эволюции генов устойчивости принято подразделять на «доантибиотический период» и период после открытия и начала широкого использования антибиотиков [10, 35, 36].

В доантибиотический период происходила эволюция генов устойчивости в условиях селективного действия природных факторов, включая разнообразные токсические вещества, в том числе антибиотики, присутствовавшие в окружающей среде, по-видимому, в относительно низких концентрациях. К этому периоду относится возникновение природной (intrinsic) устойчивости микроорганизмов в экосистемах.

Предполагается, что в доантибиотический период в основе эволюции генов лежит их диверсификация, основанная на мутациях и дупликации [36].

Филогенетический анализ показывает, что эволюция генов, кодирующих рибосомальные защитные белки — альтернативные факторы элонгации, дающие устойчивость к тетрациклинам, представляет собой долгую независимую диверсификацию нескольких кластеров этих белков [73].

При построении сложного филогенетического древа рибосомальных защитных белков, посредством которых осуществляется устойчивость к тетрациклину, и трансляционных факторов элонгации было показано, что существующая в настоящее время функция рибосомальных защитных белков возникла до того, как появились стрептомицеты, в том числе и продуценты тетрациклина. Видимо эти белки возникли независимо от присутствия тетрациклинов и служат другой задаче, нежели обеспечение устойчивости к

антибиотику. Рибосомальные защитные белки могли обеспечивать защиту рибосом от других химических веществ среды [74].

Реконструирована эволюция двух групп β -лактамаз — показано, что длительная диверсификация классов этих ферментов, как входящих в группу сериновых β -лактамаз, так и в группу металлосодержащих β -лактамаз, привела к полной утрате гомологии между классами [71, 72, 14]. Молекулярный анализ β -лактамаз из метагеномной библиотеки, полученной из «cold-seep sediments», также показывает, что основная диверсификация этих ферментов — результат не недавней, а достаточно древней эволюции [14].

В природной среде в присутствии продуцентов и синтезируемых ими антибиотических веществ происходили не только селекция генов устойчивости и мутации, повышающие уровень экспрессии этих генов, но и модификация некоторых хромосомных метаболитических генов, приобретающих защитную функцию. Выше приведены данные, показывающие возможность модификации генов, определяющих различные клеточные функции, для инактивации или выброса из клеток антибиотиков [7, 32, 33, 42, 49].

Существуют две точки зрения на значение горизонтального переноса генов для эволюции устойчивости в доантибиотический период. Первая точка зрения состоит в том, что на ранних этапах эволюции этот процесс играл существенную роль в распространении генов устойчивости. С другой стороны, на основании данных филогенетического анализа делается предположение о том, что такой механизм эволюции устойчивости как горизонтальный перенос генов в доантибиотическую эпоху не имел большого значения [10, 35, 36].

Период, начавшийся с открытия антибиотиков, характеризуется сильным селективным давлением этих веществ в разных экологических нишах, что обусловлено интенсивным использованием антибиотиков во многих областях практической деятельности человека. Эволюционное развитие устойчивости ускоряется, и происходит быстрое распространение приобретённой (acquired) устойчивости среди ранее чувствительных бактерий.

В результате селективного давления антибиотиков происходит мобилизация генов устойчивости из природных резервуаров и их быстрое распространение среди микроорганизмов из разных экологических ниш. Основную роль в распространении устойчивости в этот период играют процессы горизонтального переноса генов и участие в них мобильных генетических элементов.

Горизонтальный перенос генов с помощью мобильных генетических элементов рассматривается как мощный механизм эволюции, позволяющий микроорганизмам быстро приобретать жизненно важные селективные признаки. Роль

систем горизонтального переноса в эволюции устойчивости к антибиотикам активно изучается и обсуждается [6, 10, 33, 34]. Горизонтальный перенос генов обеспечивает обмен генетическим материалом между таксономически и экологически отдалёнными микроорганизмами.

Известно, что перенос генетической информации осуществляется системами трансформации, трансдукции и конъюгативным переносом с участием мобильных элементов — плазмид, транспозонов, интегронов и др. Открытие и изучение интегронов показало особенно важную роль этих элементов, способных включать каскадные гены, в распространении устойчивости и эволюции геномов [33].

Горизонтальный перенос генов — основной фактор быстрого распространения устойчивости среди патогенных микроорганизмов. Большинство патогенных микроорганизмов до начала широкого применения антибиотиков не обладало устойчивостью к этим веществам. Исследование коллекции штаммов энтеробактерий, выделенных в период с 1917 по 1954 гг., показало наличие конъюгативных плазмид у 24% изолятов. При этом большинство обнаруженных плазмид не содержало генов антибиотикоустойчивости. К началу 80-х гг. плазмиды, относящиеся к тем же группам и ранее не передававшие устойчивость, уже содержали гены устойчивости [75].

Широкое использование антибиотиков привело к появлению плазмид, включающих транспозоны и интегроны с генами множественной устойчивости. Введение в клиническую практику новых препаратов ведёт к появлению плазмид с генами устойчивости к этим веществам.

Долгое время существовало представление, что возникновение устойчивости к хинолонам обеспечивается хромосомными мутациями в генах, кодирующих ДНК-гиразу и топоизомеразу IV и системы эффлюкса [76, 77]. Однако уже в 1989 году плазида, содержащая ген устойчивости к хинолонам *qnr*, была обнаружена у клинического изолята *Klebsiella pneumoniae* [78]. Позднее были описаны плазмиды ряда энтеробактерий, несущие гены устойчивости к хинолонам *qnr* [66, 61]. Плазмидная локализация генов показана и для систем эффлюкса хинолонов у клинических изолятов *E.coli* [63, 64].

Была высказана гипотеза о том, что источником генов устойчивости патогенов являются обитающие в естественных условиях продуценты антибиотиков [41]. Анализ гомологии генов устойчивости к некоторым антибиотикам у продуцентов и клинических изолятов свидетельствует о возможности получения генов патогенными микроорганизмами от продуцентов, но, скорее, не о прямой передаче генетического материала, а

об общих предшественниках генов у обеих групп микроорганизмов [33, 43, 46].

Предполагается, что гены устойчивости приобретены патогенами от живущих в природных бактериальных сообществах непатогенных микроорганизмов, где эти гены существовали и эволюционировали в течение долгого времени. С усилением селективного действия антибиотиков происходила мобилизация генов устойчивости и их проникновение в другие популяции, в том числе в патогенные бактерии [7, 10, 35].

Филогенетический анализ подтверждает быстрое движение генов устойчивости к таксономически далеким патогенным и комменсальным микроорганизмам как недавнее эволюционное событие, обеспечиваемое в основном горизонтальным переносом генов. В то же время данные филогенетического анализа показывают, что в ряде случаев перенос генов именно из продуцентов не играл существенной роли в возникновении устойчивости клинических изолятов. Анализ кластеров генов *erm*, кодирующих метилазы, обеспечивающие устойчивость к макролидам, линкозамидам и стрептограмину В, не обнаружил горизонтального переноса этих генов от продуцентов. Полученные данные свидетельствуют о независимой эволюции этих генов у продуцентов и патогенов. Также показано, что гены устойчивости к ванкомицину диверсифицировались на ранних стадиях эволюции, образовав два кластера — один обнаруживается у почвенных бактерий и патогенов, другой — у стрептомицетов-продуцентов. Доказательств обмена генами между кластерами не выявлено [10].

Помимо горизонтального переноса генов существуют другие механизмы приобретения патогенами устойчивости — мутации или возможность усиления экспрессии уже имеющегося гена с низким уровнем активности [45, 74]. В эпоху активного применения антибиотиков увеличивается частота мутаций, дающих антибиотикоустойчивость, продолжается модификация и селекция генов, вовлечённых в другие клеточные процессы, но приобретающих функцию «защиты» как основную. Работы, показывающие возможность возникновения устойчивости в результате увеличения числа мутаций в присутствии антибиотиков, освещены в обзорах [45, 79]. Описано преобразование аминогликозидацетилтрансферазы в фермент, инактивирующий антибиотик-хинолон ципрофлоксацин [80].

Селективное давление антибиотиков в «антибиотическую эпоху» имеет определяющее значение, однако есть ряд и других факторов, способствующих сохранению и распространению генов устойчивости в микробных популяциях. Гены устойчивости, имеющиеся у непродуцирующих микроорганизмов, могли и не селекционироваться

именно антибиотиками, поскольку эти гены участвуют во многих процессах жизнедеятельности клетки — биосинтезе, сигнальном трафике и др. Гены, которые помимо прямой «защиты» выполняют и другие функции, могли селекционироваться не по устойчивости, а по иным функциям. Этот процесс может происходить в среде, условно называемой свободной от антибиотиков, без участия их селективного давления. Эволюционный процесс селекции гена, выполняющего функцию, отличающуюся от той, по которой он был первоначально отселекционирован, известен под названием «эксаптация», и этот термин был использован для описания эволюции антибиотикоустойчивости [32].

Гены устойчивости могут передаваться репликонами, несущими элементы, определяющие другие подверженные селекции функции. Селективными факторами являются разного рода токсичные загрязнения [10, 32]. Особенно часто осуществляется ко-селекция генов устойчивости к антибиотикам и генов, обеспечивающих устойчивость к тяжёлым металлам [81]. Процесс распространения генов устойчивости без воздействия антибиотиков приводит к тому, что детерминанты устойчивости, присутствующие в патогенах, обнаруживаются у бактерий, обитающих в местах, не имеющих истории «загрязнения» антибиотиками [82].

Селективное действие антибиотиков играет существенную роль в сохранении и закреплении в бактериальной популяции полученных генов устойчивости. Приобретение новых генов может привести к расбалансированию генно-метаболических цепей в клетке и, при отсутствии селективного отбора, к элиминации устойчивых клеток [34]. Однако устранение устойчивых микроорганизмов из популяции при отсутствии селективного действия антибиотика происходит не всегда. Более того, наблюдается замещение чувствительных микроорганизмов устойчивыми и дальнейшее распространение устойчивости. Видимо, в некоторых условиях обитания устойчивость обеспечивает определённые преимущества для развития популяции [32, 36]. Отмечен тот факт, что ограничения использования антибиотиков в сельском хозяйстве приводят лишь к умеренному снижению распространения устойчивости в продуктах питания, а не к её элиминации [83].

Высказано предположение [84] о принципиальном различии динамики соотношения чувствительных и устойчивых микроорганизмов в клинической микробиоте и в природных условиях — в почве. Авторы исходят из утверждения, что, если в клинике с 70-х годов XX века очень быстро нарастает доля устойчивых бактерий, то в почве соотношение чувствительных и устойчивых бактерий сохраняется неизменным в течение тысяч

лет и до настоящего времени, т. е. происходит сосуществование этих популяций без нарушения баланса между ними. Предложено несколько механизмов, которые могут действовать в природных условиях, контролируя распространение устойчивости.

В то же время количественная оценка генов устойчивости, проведённая с использованием метагеномного анализа образцов почв, собранных в Нидерландах за период с 1940 по 2008 год, показала значительное возрастание в почвах генов устойчивости после 70-х годов, особенно резко (в 15 раз) увеличилось к 2008 году количество генов устойчивости к β -лактамам и к тетрациклину, что совпало по времени с интенсивным использованием этих антибиотиков [85]. Независимо от динамики развития устойчивости почвенных микроорганизмов, микробиота почвы содержит огромное количество генов резистентности и является неисчерпаемым источником детерминант устойчивости.

Быстрое распространение устойчивости среди патогенных микроорганизмов в связи с широким использованием антибиотиков как в медицине, так и в различных областях хозяйственной деятельности представляет серьёзную угрозу. В 2011 году Всемирная Организация Здравоохранения выбрала устойчивость к противомикробным препаратам в качестве главной проблемы глобального здравоохранения (<http://www.who.int/world-health-day/2011/ru/>). Был разработан Европейский стратегический план действий по проблеме устойчивости к антибиотикам.

Перспективам контроля антибиотикоустойчивости посвящен обзор F. Vaquero et al. [86]. Рассматриваются и обсуждаются имеющиеся к настоящему времени экспериментальные достижения, показывающие возможность использования различных подходов для контроля возникновения и распространения устойчивости. Описывается система мер по контролю, сдерживанию и уменьшению уровня устойчивости — по преимуществу у патогенных микроорганизмов в условиях клиники. Разработанные меры включают широкий круг разнообразных воздействий на устойчивость, оказываемых на молекулярном, клеточном и популяционном уровнях, а также использование ранее предложенных известных мер по рациональному применению антибиотиков в медицине и в других отраслях.

В обзоре [87] предложены три новые стратегии специфической борьбы с устойчивостью бактерий, которые несут плазмиды, кодирующие ответственные за устойчивость к антибиотикам белки, — угнетение конъюгации плазмид, угнетение репликации плазмид и использование токсин-антитоксин систем, закодированных в плаزمиде.

Другой стороной борьбы с устойчивостью к антибиотикам является принятие ряда административных мер по обеспечению безопасности использования антибиотиков в различных областях.

Заключение

Концепция резистомы, представляя новый взгляд на объём, разнообразие и распространение устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, является концентрированным выражением обозначенных в последние годы новых направлений в исследовании резистентности. Эта концепция возникла на основе современных достижений в исследовании устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, основным трендом которых является кардинальное обращение к изучению устойчивости микроорганизмов в окружающей нас среде по сравнению с предшествующим периодом изучения преимущественно устойчивости клинических патогенов. Понятие резистомы, в частности, отражает и закрепляет новое понимание места и роли генов устойчивости к антибиотикам как фактора формирования и функционирования микробных природных популяций. К настоящему времени уже очевидно, что проблема устойчивости к антибиотикам не может быть разрешена только в границах борьбы с устойчивостью патогенных клинических штаммов, или с использованием так называемой рациональной системы применения антибиотиков, а также путём появления новых антимикробных препаратов.

Микроорганизмы, обитающие в окружающей среде, несут в себе огромное количество разнообразных генов антибиотикорезистентности. Горизонтальный перенос генов поддерживает и обеспечивает быстрое распространение устойчивости от одних микроорганизмов к другим, не только в пределах одной и той же микробиоты, но и к микроорганизмам, удалённым и таксономически и по месту обитания, вплоть до микробных сообществ патогенов. Таким образом, исследование устойчивости к антибиотикам у патогенных микроорганизмов напрямую связано с фундаментальными исследованиями устойчивости к антибиотикам тех микроорганизмов, которые населяют разнообразные экологические ниши в природных местах обитания. Решение важнейшей проблемы медицины — контроля за возникновением и распространением устойчивости к антибиотикам во многом зависит от всестороннего изучения глобальной резистомы на популяционном и молекулярном уровнях. Это может открыть новые подходы для контроля за распространением устойчивости.

ЛИТЕРАТУРА

1. D'Costa V.M., McGrann K.M., Hughes D.W., Wright G.D. Sampling the antibiotic resistome. *Science* 2006; 311: 5759: 374–377.
2. Allen H.K., Moe L.A., Roddammer J. et al. Functional metagenomics reveals diverse beta-lactamases in a remote Alaskan soil. *ISML J* 2009; 3: 2: 243–251.
3. Canton R. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: Suppl. 1: 20–25.
4. Martinez J.L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci* 2009; 276: 1667: 2521–2530.
5. Wright G.D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol* 2010; 13: 5: 589–594.
6. Aminov R.I. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front microbiol* 2011; 2: 158.
7. Wright G.D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 3: 175–186.
8. D'Costa V.M., Griffiths E., Wright G.D. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10: 5: 481–489.
9. Riesenfeld C.S., Goodman R.M., Handelsman J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 2004; 6: 9: 981–989.
10. Aminov R.I. and Mackie R.I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 271: 2: 147–161.
11. Mori T., Mizuta S., Suenaga H., Miyazaki K. Metagenomic screening for bleomycin resistance genes. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 21: 6803–6805.
12. Monier J.-M., Demanèche S., Delmont T.O. et al. Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil. *Curr Opin Microbiol* 2011; 4: 3: 236–243.
13. Biyela P.T., Lin J., Bezuidenhout C.C. The role of aquatic ecosystems as reservoir of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Water Sci Technol* 2004; 50:1: 45–50.
14. Song J.S., Jeon J.H., Lee et al. Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (south of Lihir Island, Papua NewGuinea). *J Microbiol* 2005; 43: 2: 172–178.
15. Baquero F., Martinez J.L., Canton R. Antibiotic and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* 2008; 19: 3: 260–265.
16. Demanèche S., Sanguin H., Pote J. et al. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 10: 3957–3962.
17. Dib J.R., Weiss A., Neumann A. et al. Isolation of bacteria from remote high altitude Andean lake able to grow in presence of antibiotics. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 2009; 4: 1: 66–76.
18. Pontes D.S., Pinheiro F.A., Lima-Bittencourt C.I. et al. Multiple antimicrobial resistance of gram-negative bacteria from natural oligotrophic lakes under distinct anthropogenic influence in a tropical region. *Microb Ecol* 2009; 58: 4: 762–772.
19. Wardwell L.H., Jude B.A., Moody J.P. et al. Co-selection of mercury and antibiotic resistance in sphagnumcore samples dating back 2000 years. *Geomicrobiology J* 2009; 26: 4: 238–247.
20. Bowden M. Science vs. Evolution. 1991 (Bromley, Kent, England: Sovereign Publications).
21. Lima-Bittencourt C.I., Cursino L., Gonçalves-Dotmelas H. Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater. *Genet Mol Res* 2007; 6: 3: 510–521.
22. Мундлин С.З., Соина В.С., Петрова М.А., Горленко Ж.М. Выделение устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий из многолетнемерзлых отложений Восточной Сибири. *Генетика* 2008; 44: 1: 36–44.
23. Brown M.G., Balkwill D.L. Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microb Ecol* 2009; 57: 3: 484–493.
24. Brown M. G., Mitchell E.H., Balkwill D.L. Tet 42, a novel tetracycline resistance determinant isolated from deep terrestrial subsurface bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 12: 4518–4521.
25. 3rd Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment. ARAE. Tour — Vinci, 1–3 June 2009; 118.
26. Sorum H., Sunde M. Resistance to antibiotic in the normal flora of animals. *Vet Res* 2001; 32: 3–4: 227–241.
27. Tomasz A. Weapons of microbial drug resistance abound in soil flora. *Science* 2006; 311: 5759: 342–343.
28. Schmitt H., Stoob K., Hamscher G et al. Tetracycline and tetracycline resistance genes in agricultural soils: microcosm field studies. *Microb Ecol* 2006; 51: 3: 267–2765.
29. Schmitt H., Greve G., Meisner A. Microcosm studies on the role of manure and antibiotic for resistance development in agricultural soils. *ARAE* 2009; 55.
30. Chee-Sanford J.C., Aminov P.I., Krapac I.J. et al. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 41494–1502.
31. Chee-Sanford J.C., Mackie R.I., Koike S. et al. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J Environ Qual* 2009; 38: 3: 1086–1108.
32. Alonso A., Sanchez P., Martinez J.L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ microbiol* 2001; 3: 1: 1–9.
33. Мундлин С.З., Петрова М.А., Басс И.А., Горленко Ж.М. Происхождение, эволюция и миграция генов лекарственной устойчивости. *Генетика* 2006; 42: 11: 1495–1511.
34. Шестаков С. В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий. *Экол генетик* 2007; 5: 2: 22–24.
35. Baquero F., Alvarez-Ortega C., Martinez J.L. Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environ Microbiol Reports* 2009; 1: 6: 469–476.
36. Aminov R.I. The role of antibiotic and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol* 2009; 11: 12: 2970–2988.
37. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 74: 3: 417–433.
38. Звягинцев Д.С., Виноградова К.А., Ефременкова Л.М. Прямое микроскопическое выявление в почве актиномицета — продуцента люминесцирующего антибиотика. *Микробиология* 1976; 45: 2: 337–341.
39. Degtyareva E.A., Vinogradova K.A., Aleksandrova A.V., Filonenko V.A., Kozhevnikov P.A. Soil actinomycetes as potential biofungicides. ISSN 0147-6874. Moscow University Soil Science Bulletin 2009; 64: 2: 73–77 Allerton Press, Inc.
40. Виноградова К.А., Кожевин П.А. Взаимоотношения актиномицетов с почвенными грибами и их использование для биологического контроля фитопатогенов. *Микол фитопатол* 2011; 45: 4: 289–302.
41. Benveniste R., Davies J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc Nat Acad Sci USA* 1973; 70: 8: 2276–2280.
42. Piepersberg W., Distler J., Hienzel P., Perez-Gonzales J.A. Antibiotic resistance by modification: many resistance genes could be derived from cellular control genes in actinomycetes. A hypothesis. *Actinomycetologica* 1988; 2: 83–98.
43. Hon W.C., McKay G.A., Thompson P.R. et al. Structure of an enzyme required for aminoglycoside antibiotic resistance reveals homology to eukaryotic protein kinases. *Cell* 1997; 89: 6: 885–695.
44. Wright G.D., Thompson P.R. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front Biosci* 1999; 4: D9–21.
45. Shaw K.J., Rather P.R., Yare R.S., Miller G.H. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993; 57: 1: 138–163.
46. Heinzel P., Werbitzky O., Distler J., Piepersberg W. A second streptomycin resistance gene from *Streptomyces griseus* codes for streptomycin-3''-phosphotransferase. Relationships between antibiotic and protein kinases. *Arch Microbiol* 1988; 150: 2: 184–192.
47. Wright G.D., Ladak P. Overexpression and characterization of the chromosomal aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase from *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 5: 956–960.
48. Paye K.G., Rather P.N., Clarke A.J. Contribution of gentamicin-2'-acetyltransferase to the O-acetylation of peptidoglycane in *Providencia stuartii*. *J Bacteriol* 1995; 177: 15: 4303–4310.
49. Knox J.R., Moews P.C., Frere J.M. Molecular evolution of bacterial beta-lactam resistance. *Chem Biol* 1996; 3: 11: 937–947.
50. Massova I., Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1: 1–17.

51. Meroueh S.O., Minasov G., Lee W. et al. Structural aspects for evolution of beta-lactamases from penicillin-binding proteins. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 32: 9612–9618.
52. Poirel L., Kampfer P., Nordmann P. Chromosome-encoded Amber class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 12: 4038–4040.
53. Daiyasu H., Osaka K., Ishino Y., Toh H. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the beta-lactamase fold. *FEBS Lett.* 2001; 503: 1: 1–6.
54. Lubelski J., Konings W.N., Driessen A.J. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; 71: 3: 463–476.
55. Martinez J.L., Sanchez M., Martinez-Solano L. et al. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33: 2: 430–449.
56. Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000; 406: 6799: 959–964.
57. Piddock L.J. Multidrug-resistance efflux pumps: not just for resistance. *Nature Rev Microbiol* 2006; 4: 8: 629–636.
58. Alonso A., Morales G., Escalante R. et al. Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 3: 432–434.
59. Булгакова В.Г., Орлова Т.И., Полин А.Н. Устойчивость актиномицетов-продуцентов к собственным антибиотикам. *Антибиотики и химиотер* 2010; 55: 1–2: 42–49.
60. Robicsek A., Jacoby G.A., Hooper D.C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 10: 629–640.
61. Sanchez M.B., Hernandez A., Rodrigues-Martinez J.M. et al. Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiol* 2008; 8: 148.
62. Alonso A., Rajo F., Martinez J.L. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ Microbiol* 1999; 1: 5: 421–430.
63. Périchon B., Courvalin P., Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 7: 2464–2469.
64. Yamane K., Wachino J., Suzuki S. et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 9: 3354–3360.
65. Tran J.N., Jacoby G.A., Hooper D.C. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1: 118–125.
66. Poirel L., Rodriguez-Martinez J.M., Mammeri H. et al. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 8: 3523–3525.
67. Poirel L., Liard A., Rodriguez-Martinez J.M., Nordmann P. *Vibrionaceae* as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 56: 6: 1118–1121.
68. Hegde S.S., Vetting M.W., Roderick S.L. et al. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* 2005; 308: 5727: 1480–1483.
69. Pesci E.S., Milbank J.B.J., Pearson J.P. et al. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Nat Acad Sci USA* 1999; 96: 20: 11229–11234.
70. Baltz R.H. Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall? *SIM News* 2005; 55: 186–196.
71. Hall B.G., Barlow M. Evolution of the serine β -lactamases: past, present and future. *Drug Resist. Updat.* 2004; 7: 2: 111–123.
72. Garau G., Di Guilmi A.M., Hall B.G. Structure-based phylogeny of the metallo-beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 7: 2778–2784.
73. Aminov R.I., Garrigues-Jeanjean N., Mackie R.I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1–6: 22–32.
74. Kobayashi T., Nonaka L., Maruyama F., Suzuki S. Molecular evidence for the ancient origin of the ribosomal protection protein that mediates tetracycline resistance in bacteria. *J Mol Evol* 2007; 65: 3: 228–235.
75. Datta N., Hughes V.M. Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature* 1983; 306: 5943: 616–617.
76. Martinez J.L., Alonso A., Gomez-Gomez J.M., Baquero F. Quinolone resistance by mutations in chromosomal gyrase genes. Just the tip of the iceberg? *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 6: 683–688.
77. Hooper D.C. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat* 1999; 2: 1: 38–55.
78. Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby G.A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351: 9105: 797–799.
79. Heinemann J.A. How antibiotics cause antibiotic resistance. *Drug Discov Today* 1999; 4: 2: 72–79.
80. Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G.A. et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Med* 2006; 12: 1: 83–88.
81. Wright M.S., Peltier G.L., Stepanauskas R., McArthur J.V. Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams. *FEMS Microbiol Ecol* 2006; 58: 2: 293–302.
82. Palleschi L., Bartoloni A., Paradisi F., Rossolini J.M. Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6: 5: 725–732.
83. Zhang L., Kinkelaar D., Huang Y. et al. Acquired antibiotic resistance: are we born with it? *Environ Microbiol* 2011; 77: 20: 7134–7141.
84. Chait R., Vetsigian K., Kishony R. What counters antibiotic resistance in nature? *Nature Chem Biol* 2012; 8: 1: 2–5.
85. Knapp C.W., Dolfing J., Ehlert P.A., Graham D.W. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Technol* 2010; 44: 2: 580–587.
86. Baquero F., Coque T.M., de la Cruz F. Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 8: 3649–3660.
87. Williams J.J., Hergenrother J. Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 2008; 12: 4.

Лечение вирусных инфекций посредством применения в комплексной терапии индукторов интерферона

М. Г. РОМАНЦОВ¹, Ф. И. ЕРШОВ², А. Л. КОВАЛЕНКО³, Д. С. СУХАНОВ¹, О. М. ЛИБЕРАНСКАЯ³

¹ ГБОУ ВПО «Северо-Западный медицинский университет им. И. И. Мечникова», Санкт-Петербург

² ГУН «НИИ ЭМ им. Н. Ф. Гамалеи», Москва

³ ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», Санкт-Петербург

Virus Infections and Interferon Inductors in the Complex Therapy

M. G. ROMANTSOV, F. I. ERSHOV, A. L. KOVALENKO, D. S. SUKHANOV, O. M. LIBERANSKAYA

I. I. Mechnikov North-Western Medical University, St. Petersburg

N. F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

POLYSAN Co, St. Petersburg

Представлены индукторы интерферона различных химических групп, относящиеся к противовирусным средствам, описана индукция разных типов эндогенного интерферона в сыворотке крови. Показана эффективность Циклоферона в комплексном лечении хронического гепатита С, туберкулеза на фоне ВИЧ-инфекции, арбовирусных заболеваний, гриппа и ОРВИ.

Ключевые слова: индукторы интерферона, антивирусное действие, циклоферон, цитокины, иммунный ответ.

Interferon inducers of various chemical groups, belonging to antivirals, and induction of several types of endogenous interferon in blood serum are described. Cycloferon was shown efficient in the complex treatment of chronic hepatitis C, tuberculosis in HIV-infected subjects, arbovirus diseases, influenza and acute respiratory virus infections.

Key words: interferon inducers, antiviral activity, cycloferon, cytokines, immune response.

Индукторы эндогенного интерферона (ИЭИ) — самостоятельный класс высоко- и низкомолекулярных природных и синтетических соединений, способных «включать» систему интерферона (ИФН), вызывая в клетках синтез эндогенных интерферонов [1].

Интерфероны относятся к цитокинам (медиаторам иммунитета) и представлены семейством белков, обладающих антивирусной, иммуномодулирующей и другими видами активности. Представители семейства ИФН составляют важные индукторы естественного противовирусного ответа, влияющие на процесс адаптивного иммунного ответа, осуществляя распознавание и элиминацию чужеродной генетической информации. Система ИФН характеризуется быстрым реагированием, являясь одной из важнейших составляющих естественного иммунитета, во многом определяя течение и исход вирусных инфекций [2].

Условием для клинического применения ИЭИ является безопасность, специфическая активность и отсутствие токсичности [1]. Из вы-

сокомолекулярных соединений следует отметить синтетические РНК — амплиген, полигуацил и полудан; из природных РНК — ларифан, ридостин. Группа ароматических углеводов представлена полифенолами природного происхождения, к которым относятся рагосин, кагоцел, саврац и гозалидон. К ароматическим соединениям, в которых активные ИЭИ встречаются наиболее часто, следует отнести флюореноны и акриданоны, производные карбоновых кислот [3, 4].

В результате целенаправленного скрининга высоко- и низкомолекулярных соединений природного и синтетического происхождения выявлены группы веществ, среди которых ИЭИ встречаются наиболее часто. Внутри этих групп обнаружены перспективные вещества, индуцирующие синтез ИФН, циркулирующий в кровотоке, пригодные для профилактики и лечения вирусных инфекций и заболеваний невирусной этиологии [2].

В табл. 1 представлена современная классификация индукторов эндогенного интерферона, включающая синтетические и природные соединения с основной интерферониндуцирующей активностью, а также иммуотропные препараты,

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 191015 Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41. СЗМУ им. И. И. Мечникова

Таблица 1. Классификация индукторов интерферона

Химическая группа	Препарат (коммерческое название)
А. СИНТЕТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ С ОСНОВНОЙ ИНТЕРФЕРОНИНДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ	
Флуореноны	Амиксин
Акриданоны	Циклоферон
Олигопептиды	Аллокин
Производное имидазо (4,5-С) квинолина	Имиквимод (Альдара)
Полимеры (дс-РНК)	Полудан, Полигуацил
Б. ПРИРОДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ С ОСНОВНОЙ ИНТЕРФЕРОНИНДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ	
Полифенолы	Кагоцел, Мегосин, Саврац, Рагосин, Гозалидон
Полимеры (дс-РНК)	Ридостин, Ларифан
Производные флавоноидов и аминокислот	Протефлазид
В. ИММУНОТРОПНЫЕ ПРЕПАРАТЫ С ВТОРИЧНОЙ ИНТЕРФЕРОНИНДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ	
Т-миметики	Тимоген, Тактивин, Изопринозин (Гропринозин), Иммунофан
Иммуномодуляторы бактериального происхождения — эубиотики	Лактобактерин, Биоспорин
Вакциноподобные препараты	Бронхомунал, Рибомунил, ИРС-19, Уроваксом
Липополисахариды	Пирогенал, Продигиозан
Производные нуклеиновых кислот	Натрия нуклеинат
Препараты пурина и пиримидина	Метилурацил, Пентоксил
Производные бензимидазола	Дибазол
Производные индола	Арбидол
Растительные иммунокорректоры	Родиола розовая, Гексал (Экстракт эхинацеи)
Г. ПРЕПАРАТЫ ДРУГИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП С ВТОРИЧНОЙ ИНТЕРФЕРОНИНДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ	
Метилксантины	Теofilлин, Эуфиллин, Дипиридамол (Курантил), Кофеин
Производные изохинолина	Папаверин, Но-шпа
Производные бензофурана	Кордарон
Производные хромена	Интеркордин

обладающие вторичной интерферониндуцирующей активностью; отдельно выделены препараты разных фармакологических групп, у которых подтверждена вторичная интерферониндуцирующая активность [5].

Так, у противовирусного препарата Арбидол, специфически подавляющего вирусы гриппа А и В, выявлена интерферониндуцирующая активность. Полифенолы (Кагоцел, Саврац) подавляют репликацию вирусов, реагируют с аминогруппами пуриновых и пиридиновых соединений нуклеиновых кислот вирусов. Циклоферон способствует снижению вирусиндуцированного блокирования синтеза собственных белков, нарушает процесс «одевания» вируса в оболочку, препятствует сборке вирионов. Циклоферон обладает как прямым, так и опосредованным действием на различные звенья иммунитета. Иммуномодулирующий эффект Циклоферона заключается в стимуляции стволовых клеток костного мозга, активации макрофагов и их миграции в ткани, в завершении фагоцитоза, усилении активности цитотоксических Т-лимфоцитов посредством индукции эндогенного ИФН. Циклоферон является индуктором синтеза мРНК для ИФН- γ , ИЛ-2-6-1, являясь индуктором смешанного (Th1/Th2) типа иммунного ответа. Двухспиральные ИЭИ (Ларифан, Ридостин, Полудан) являются поликлональными стимуляторами, вызывая продукцию ИФН у широкого круга популяций клеток (Т- и В-лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, гранулоциты), стимулируя продук-

цию ИФН. Подобно иммуномодулятору полиоксидонию Циклоферон и препараты дсРНК осуществляют свою иммуностимулирующую активность воздействием на клетки макрофагально-фагоцитарной системы, куда они проникают посредством эндоцитоза [1, 6, 7].

К наиболее востребованным интерферониндуцирующим препаратам с высокой доказательной базой относится представитель группы акриданонов Циклоферон, являющийся меглюминовой солью акридонуксусной кислоты. Препарат в дозе 4—14 мг/кг вызывает продукцию α/β , γ , λ -ИФН в период от 2 до 72 часов от момента введения, реализуя антивирусную, иммуномодулирующую активность [7].

Диапазон интерферониндуцирующих доз различается у препаратов, относящихся к разным классам соединений. Так, максимальная интерферониндуцирующая активность полинуклеотидов (Амплиген, Полигуацил) установлена при концентрации препаратов, равной 25—50 мкг/мл, а производные госсипола (Кагоцел, Саврац) осуществляют максимальную индукцию синтеза ИФН в дозе 125—150 мкг/мл. Способность индуктора вызывать синтез ИФН в той или иной ткани играет ключевую роль в распределении ИФН в организме. При введении Ларифана ИФН начинает определяться в мышцах, селезенке и мозге животных, достигая максимума через 4—8 часов после приема препарата. В печени, легких и сыворотке крови максимум накопления отмечается только через 48 часов, причём кон-

центрация ИФН в лёгких, печени, мозге и селезёнке в 4—8 раз выше уровня ИФН в сыворотке крови [3, 4, 8].

Данные о способности ИЭИ индуцировать синтез ИФН в органах и тканях позволяют судить о перспективах их клинического применения. Из известных сегодня индукторов наиболее активную продукцию ИФН вызывает Циклоферон, индуцирующий в организме животных до 1 000 000 ЕД/мл и в культурах клеток лимфоцитов человека до 1280—2560 ЕД/мл ИФН. Активными индукторами ИФН оказались и растительный полифенол (Рагосин), вызывающий продукцию ИФН в концентрации 1280 ЕД/мл, а также Ларифан (до 8000 ЕД/мл) [5].

Иммунный ответ на антиген, передающийся воздушным путём, зависит от комплексного взаимодействия факторов естественного (врождённого) и адаптивного (приобретённого) иммунитета, от клеток слизистой оболочки (дендритные, эпителиальные) верхних дыхательных путей, антигенов, Т- и В-лимфоцитов и неспецифических факторов защиты верхних дыхательных путей. Вирусы гриппа уничтожаются в течение нескольких часов механизмами естественного иммунитета, который не требует длительного периода индукции (слизь, интерферон, комплемент, антигенпредставляющие клетки, натуральные киллеры). Если вирус гриппа избегает этих ранних защитных механизмов, то он обнаруживается и уничтожается адаптивными механизмами, где Т- и В-лимфоциты и их продукты функционируют как антигенспецифические эффекторы (цитотоксические Т-клетки, антитела) [9].

Однако не все индукторы способны защищать организм от вируса гриппа в одинаковой степени, образующийся ИФН не успевает защитить организм от быстро развивающейся («острой») инфекции. Сегодня очевидной становится проблема качественно новых подходов к профилактике и лечению гриппа и ОРВИ, ибо вакцинация против гриппа не может защитить от возбудителей ОРВИ. Поэтому весьма актуальны препараты, способствующие быстрой индукции ИФН, в частности Циклоферон (индукция ИФН начинается через 2 часа после приёма препарата) может быть применен с лечебной и профилактической целью как препарат «скорой помощи». Уже через 2 часа после применения концентрация ИФН обнаруживается в крови, а через 4—6 часов — в тканях лёгких, что обуславливает его эффективность против респираторных заболеваний и гриппа [5, 8, 10].

Фармакологические эффекты Циклоферона осуществляются за счёт его сродства к рецепторам альвеолярных макрофагов, вызывая интенсивную продукцию ИФН в лёгких, активацию естественного и коррекцию адаптивного иммунитета. Прямое воздействие Меглума акридоната, к ко-

торому больные ОРВИ и гриппом чувствительны в 73% случаев, связано с подавлением репликации вируса, что делает его препаратом выбора, при респираторных инфекциях и гриппе.

Сезон эпидемического подъёма респираторной заболеваемости 2009—2010 гг. характеризовался наличием смешанной (вирусно-вирусной) микстинфекции, циркулировали вирусы гриппа А — H1N1/09 и H3N2 у 14 и 4% наблюдаемых, парагриппа, адено- и РС-вирус (соответственно в 11 и 4% случаев). Циклоферон обеспечивал минимизацию синдрома интоксикации, катарального синдрома, нормализовал температурную реакцию на 4-е сутки приёма препарата без использования антибактериальных средств, снижалась частота случаев и продолжительность ОРВИ и гриппа. Показано выраженное цитопротекторное действие на слизистую оболочку полости носа, снижалась деструкция нейтрофилов, плоского цилиндрического эпителия, лимфоцитов. Содержание sIgA в ротоглоточной жидкости увеличилось в 4,5 раза, сохраняясь на высоком (410,62 мг/л) уровне спустя 1 месяц, уровень лизоцима увеличился после приёма Циклоферона на 24,2%. У больных группы сравнения указанных изменений не наблюдалось [11—15].

Циклоферон, как и некоторые другие индукторы, имеет сродство к рецепторам клеток Купфера и стимулирует синтез ИФН в печени, в связи с чем эффективен против вирусных гепатитов [8]. В ближайшие годы прогнозируют повсеместное распространение гепатотропных вирусных инфекций и неуклонный рост числа больных хроническим гепатитом. У 7—16% больных формируется цирроз печени при естественном течении HCV-инфекции через 8—16 лет, в 1,3% случаев развивается гепатоцеллюлярная карцинома, а 3,7% случаев больные погибают вследствие прогрессирующего поражения печени. В исходе хронического гепатита С у большинства больных развивается цирроз печени, а 15% больных погибает [11].

Хронический гепатит С является малосимптомной инфекцией, протекает с умеренно выраженным цитолитическим синдромом и высоким или умеренным уровнем виремии, у больных диагностируется II—III степень иммунных расстройств. Обнадёживающей и адекватной перспективой лечения больных хроническим гепатитом С является комбинация препаратов, подавляющих репликацию вируса, с индукторами интерферона. Оценивая результаты исследований по влиянию режимов противовирусной терапии с включением Циклоферона у больных хроническим гепатитом С генотипа 1b, не ответившим на ранее проводимую терапию, установлен клинический эффект, проявившийся полным ответом у 38,4% больных (по результатам PCR и активнос-

Таблица 2. Влияние Циклоферона на HCV

Условия обработки пробы культуральной жидкости из HCV-инфицированных культур клеток МТ4	Титры HCV (lg) на день наблюдения за инфицированными культурами клеток	
	4-й день	7-й день
Циклоферон	1,5	6,0
Контроль (без обработки)	3,6	11,5

ти АлАТ), устойчивый вирусологический ответ в течение 18 месяцев наблюдения у 30,7%, биохимический — у 41% пациентов. У больных, получавших трёхкомпонентную терапию (Рибавирин+Интераль+Циклоферон) к 48-й неделе лечения уже у 68% больных РНК HCV не определялся, а у больных, не получавших Циклоферон, отсутствие вируса регистрировалось только у 27,2% больных. Фармакоэкономический анализ у получавших трёхкомпонентную терапию показал, что соотношение затраты/эффективность составило 25,9 против 32,8 у не получавших Циклоферон. Благодаря синергизму препаратов обеспечивается лучший фармакотерапевтический эффект, а трёхкомпонентная терапия является перспективным способом лечения [16—18].

Лечение детей с генотипом HCV 1b с применением комбинации препаратов (Интераль+Циклоферон) дало весьма обнадеживающие результаты — исчезновение РНК через 6 месяцев от начала лечения у 62,5% больных. Отмечено влияние препаратов на иммунную систему больных детей [20]. Положительный клинический эффект препаратов сопровождался активацией синтеза IL-1 и ИФН- γ с существенным сдвигом баланса цитокинов Th1/Th2 в сторону Th1. Циклоферон снижал уровень TNF- α , повышал концентрацию ИФН- γ , а курс Интералья и Циклоферона способствовал снижению исходно высоких уровней TNF- α и ИЛ-1 [19]. Меглумина акридоацетат существенно снижал титры HCV [15]. В инфицированных вирусом клетках в культуре МТ4 ингибируется активность ИФН, ИЛ-2,4,6, заметно (до 11,5 lg) нарастают титры вируса. Обработка инфицированных клеток Циклофероном восстанавливает активность мРНК цитокинов на фоне выраженной ингибиции вируса. При вирусном ответе определённую роль играет ИЛ-4, который подавляется HCV, но ингибиция преодолевается Циклофероном, что играет важную роль в подавлении инфекционной активности.

Можно полагать, что Циклоферон весьма перспективен при его использовании для снижения инфекционной активности HCV, поскольку препарат в 1,9—2,4 раза снижает активность вируса (табл. 2).

ВИЧ-инфекция, оказывая значительное влияние на течение туберкулёза, снижает иммунный ответ, что приводит к увеличению числа случаев повторного заражения и развития туберкулёза, приводящего к смерти. С другой стороны, тубер-

кулёз у больных ВИЧ/СПИДом выступает в качестве оппортунистической инфекции, знаменуя собой терминальную стадию основного заболевания. Увеличивается число больных ВИЧ/СПИДом + туберкулёз, нуждающихся в назначении зарубежных, не всегда доступных для применения, дорогостоящих антиретровирусных и противотуберкулёзных препаратов. В связи с этим возникает необходимость использования эффективных отечественных препаратов. Применение препаратов интерферонового ряда (Интераль, Ингарон) и индуктора интерферона (Циклоферон) показано больным с уровнем CD4+ выше 350 кл/мкл — для предотвращения перехода ВИЧ-инфекции в стадию СПИДа. Иммунокорригирующее действие Циклоферона у пациентов с иммунным резервом способствует относительно быстрой ликвидации симптомов туберкулёзной интоксикации и уменьшению респираторных проявлений [21, 22].

Мозговая ткань синтезирует ИФН в ответ на заражение вирусами, способными размножаться в ЦНС. Клетками-продуцентами являются клетки нейроглии, выстилающие стенки желудочков мозга, а концентрация ИФН в мозге при системном введении индуктора определяется его возможностью проникать через гематоэнцефалический барьер.

Циклоферон в комбинации с Рибавирином при арбовирусных инфекциях уменьшают число случаев тяжёлых форм заболевания, минимизируют синдром интоксикации, наблюдается раннее разрешение геморрагического синдрома, сокращение частоты осложнений за счёт стимуляции неспецифических механизмов, активирующих метаболическую активность фагоцитов, позволяя в комплексной терапии арбовирусных инфекций повышать эффективность терапии [7, 23, 24].

Интерферониндуцирующая активность любого индуктора *in vivo* определяется сродством конкретного препарата к рецепторам той или иной популяции иммунных клеток. В ответ на конкретный индуктор в синтезе ИФН могут принимать участие различные клетки иммунной системы, но некоторые индукторы обладают уникальной способностью «включать» продукцию ИФН только в определённых популяциях клеток, что является преимуществом перед поликлональной стимуляцией иммунных клеток интерфероном. Универсальными продуцентами ИФН являются лейкоциты периферической крови. В ответ на индукцию они синтезируют 2 или более

пика ИФН, что свидетельствует об участии различных популяций лимфоцитов в его продукции. Гранулоциты, выделенные из лейкоцитарной массы периферической крови, синтезируют один пик продукции ИФН. Универсальными продуцентами ИФН в организме являются лимфоидные ткани. Иммуноциты начинают отвечать синтезом ИФН через разные промежутки времени вне зависимости от применённого к ним стимула. Деление общего пула лимфоцитов на субпопуляции Т- и В-лимфоцитов с помощью иммуноглобулина специфически связывающего В-клетки, позволило установить, что синтез «позднего» ИФН осуществляют в основном Т-лимфоциты. Так, «поздний» ИФН, образующийся в культурах лимфоцитов при воздействии высокомолекулярных индукторов растительного происхождения (Гозалидон, Саврац) и низкомолекулярного индуктора ИФН Амиксина, синтезируют Т-клетки. Наоборот, В-лимфоциты в ответ на индукцию Циклофероном, осуществляют продукцию «раннего» ИФН. Поэтому скорость накопления ИФН в организме определяется степенью участия той или иной популяции иммуноцитов в продукции ИФН в ответ на применённый индуктор. Циклоферон реализует свои интерферониндуцирующие способности, в основном, стимулируя продукцию ИФН в культурах В-лимфоцитов, в меньшей степени — в Т-лимфоцитах. Двухспиральные ИЭИ (Полудан, Амплиген, Ларифан, Ридостин) являются поликлональными стимуляторами, способны вызывать синтез ИФН в клетках мононуклеарно-фагоцитарной системы. Наиболее активный синтез ИФН в ответ на введение двухспиральных РНК осуществляют Т-клетки, которые продуцируют интерфероны только в присутствии макрофагов [1, 3, 5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорян С. С. Индукторы интерферона: итоги и перспективы. Интерферону — 50 лет / Юбилейный сборник, посвящённый открытию интерферонов / Под ред. Ф. И. Ершова. М.: 2007; 66—71.
2. Ершов Ф. И., Наровлянский А. Н. Основные итоги изучения системы интерферона к 2011 г. Интерферон 2011: сборник научных статей. М.: 2012; 14—34.
3. Тазулахова Э. Б. Индукция и продукция интерферонов. Система интерферона в норме и патологии / Ф. И. Ершов. М.: 1996; 71—87.
4. Соколова Т. М. Иммунное узнавание вирусных нуклеиновых кислот приводит к индукции интерферонов и воспалительных цитокинов. М.: Сборник научных статей. 2011; 52—62.
5. Ершов Ф. И., Тазулахова Э. Б. От чего зависят эффекты индукторов интерферона? Интерферон 2011: сборник научных статей. М.: 2012; 80—106.
6. Романцов М. Г., Ершов Ф. И. Иммунный ответ при вирусных инфекциях. Часто болеющие дети: современная фармакотерапия. М.: 2009; 134—142.
7. Баженова Е. Д. Циклоферон: механизм действия, функции и применение в клинике. Экспер клин фармакол 2012; 7: 40—44.
8. Индукторы интерферона как противовирусные препараты этиотропного действия / Ф. И. Ершов, О. И. Киселев. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: 2005; 211—220.
9. Степанова Л. А. Иммунный ответ на гриппозную инфекцию. Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика / Под редакцией О. И. Киселева, Л. М. Цыбаловой, В. И. Покровского. М.: 2012; 82—108.
10. Деева Э. Г., Киселев О. И. Противовирусные препараты: интерфероны и индукторы интерферонов. Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика / Под ред. О. И. Киселева, Л. М. Цыбаловой, В. И. Покровского. М.: 2012; 338—345.
11. Юшук Н. Д., Бокова Н. О., Знойко О. О. Оптимизация диагностических подходов в тактике ведения больных гриппом. Леч врач 2012; 10: 64—67.
12. Петрова А. Г. Лечение острых респираторных заболеваний и гриппа. Поликлиника 2012; 58—59.
13. Лазуткина Е. Л., Лазаренко Л. Л., Ландышев Ю. С. Эффективность применения индуктора интерферона в период обострения бронхиальной астмы на фоне острой респираторной вирусной инфекции. Нов хир 2012; 43: 23—27.
14. Ершов Ф. И., Коваленко А. Л., Романцов М. Г. Вопросы лечения гриппа и ОРВИ у детей. Экспер клин фармакол 2011; 6: 41—45.
15. Ершов Ф. И., Наровлянский А. Н., Мезенцева М. В. Ранние цитокиновые реакции при вирусных инфекциях. Цитокины и воспаление. 2004; 1: 3—6.
16. Вирусные гепатиты. Антивирусные средства в педиатрии / Ф. И. Ершов, М. Г. Романцов. М.: 2005; 179—194.

Заключение

Ведущая роль в борьбе с патогенами принадлежит системе интерферона. Это не только первая линия защиты организма от вирусных инфекций, препятствующая проникновению инфекционного начала внутрь клетки и размножению патогена, но и пусковой механизм цитотоксического ответа и адаптивного иммунитета. Для успешного лечения как острых, так и хронических заболеваний Циклоферон следует применять как можно раньше, при средних «вирусных нагрузках» (200—500 копий), усиливая их эффект препаратами направленного этиотропного действия, и иммуномодуляторами, обеспечивая наиболее оптимальный фармакотерапевтический эффект.

17. Сологуб Т. В., Шульдjakов А. А., Горячева Л. Г. Эффективность использования циклоферона в терапии хронического гепатита В. Антибиотики и химиотер 2011; 9: 37—41.
18. Романцов М. Г., Сологуб Т. В., Горячева Л. Г. Патогенетически обоснованная, с оценкой качества жизни, расчётом риска исхода заболевания, терапия больных вирусным гепатитом С. Антибиотики и химиотер 2010; 3—4: 45—54.
19. Горячева Л. Г. НВ-НС-вирусная инфекция у детей, инфицированных в раннем возрасте. Автореф. дисс. ... д. м. н. Санкт-Петербург. 2005.
20. Васильева Д. К., Горячева Л. Г., Монахова Н. Е. Особенности иммунного ответа детей с хроническим гепатитом С, получавших этиотропную и патогенетическую терапию. Экспер клин фармакол 2011; 12: 33—35.
21. Иванов А. К., Пантелеев А. М., Суханов Д. С. Применение циклоферона в комплексном лечении больных туберкулёзом, инфицированных ВИЧ и вирусными гепатитами. Клин мед 2010; 5: 71—76.
22. Иванов А. К., Сологуб Т. В., Пантелеев А. М. Комплексное лечение больных туберкулёзом, инфицированных ВИЧ, с применением циклоферона. Экспер клин фармакол 2010; 1.
23. Черенов И. В., Галимзянов Х. М., Сологуб Т. В. Оценка эффективности противовирусных средств в терапии крымской геморрагической лихорадки. Клин мед 2012; 4: 59—62.
24. Шерышева Ю. В., Галимзянов Х. М., Коваленко А. Л. Оценка безопасности и фармакологической эффективности применения циклоферона при лечении астраханской риккетсиозной лихорадки. Антибиотики и химиотер 2012; 1: 26—31.

Имипенем: 30 лет терапии

С. В. СИДОРЕНКО, И. В. ПАРТИНА, В. А. АГЕЕВЕЦ

ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург

Imipenem: 30-Year Experience in Therapy

S. V. SIDORENKO, I. V. PARTINA, V. A. AGEEVETS

Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg

Введение

Антибиотики бета-лактамной структуры относятся к группе первых препаратов, позволивших бороться с инфекционными заболеваниями. Однако применение антимикробной терапии в медицинской практике привело к накоплению в микробных популяциях генов устойчивости к применяемым антибактериальным препаратам. В последние десятилетия распространение антибиотикоустойчивых бактерий становится очевидной проблемой здравоохранения. В этой связи способность преодолевать наиболее важные механизмы резистентности бактерий становится важнейшим требованием к антибактериальным препаратам наряду с хорошей переносимостью. В 1980 году был разработан первый карбапенемный антибиотик — имипенем, успешно сочетающий перечисленные качества. С тех пор он имеет важное практическое значение и успешно применяется при лечении пациентов с тяжёлыми полирезистентными инфекциями.

Химические свойства имипенема

Имипенем: N-формимидоилтиенамицин или (5S,6R)-3-[[[2-(формимидоиламиноэтил)тио]-6-[R]-1-оксиэтил]-7-оксо-1-азабицикло[3,2,0]гепт-2-ен-2-карбоновая кислота (рис. 1).

Имипенем является производным тиенамицина (Thienamycin), полученного в 1976 г. из актиномицетного организма *Streptomyces cattleya*. Имипенем стабильнее тиенамицина в 5–10 раз. Замена серной группы на метильную привела к увеличению антибактериальной активности, а также повысила стабильность бета-лактамного кольца. Имипенем легко разрушается в почках ферментом дегидропептидазой-1, поэтому применяется вместе с ингибитором этого фермента — циластатином натрия. Циластатин не только препятствует разрушению антибиотика, но и за-

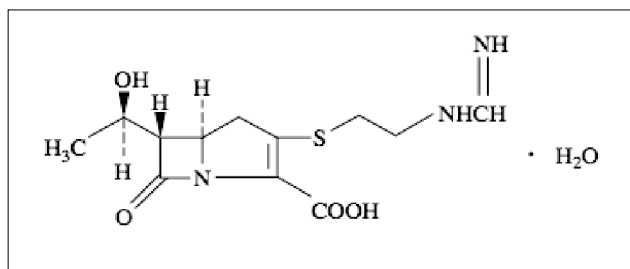


Рис. 1. Химическое строение молекулы имипенема.

щищает почки от возможного токсичного эффекта имипенема в высоких концентрациях. Имипенем и циластатин применяются в соотношении 1:1, но так как циластатин не имеет антибактериальной активности только концентрация имипенема используется для расчёта дозы.

Механизм действия имипенема

Подобно другим бета-лактамам, имипенем ингибирует синтез клеточной стенки бактерий, связываясь и инактивируя транспептидазу — фермент, известный также как пенициллин-связывающий белок — ПСБ (PBP). Подробное изучение этого механизма показало, что препарат блокирует в клетках *Escherichia coli* работу ферментов PBP-1A, PBP-1B, PBP-2 и D-аланин-карбоксипептидазную активность ферментов PBP-4 и PBP-5. Имипенем также ингибирует трансглюкозилазную активность PBP-1A, но слабо ингибирует PBP-3, что отличает его от других бета-лактамов, включая других представителей группы карбапенемов, которые преимущественно связываются с PBP-1 и PBP-3. Таким образом, имипенем индуцирует формирование клеточной оболочки с последующим её разрывом, но не филаментозный рост, что характерно для других бета-лактамов. Это позволяет уменьшить количество липополисахарида, высвобождающегося при лизисе клеток бактерий. Клиническая значимость данного эффекта была продемонстрирована на пациентах с урогенитальными инфекциями. Сравнение эффективности имипенема и

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.9. НИИ детских инфекций

цефтазидима показало, что применение имипенема обеспечивает более быстрое снижение повышенной температуры у пациентов, снижение уровня бактериальных эндотоксинов, а также быструю нормализацию уровня цитокинов.

Механизм действия имипенема обеспечивает его активность в отношении аэробных и анаэробных грамположительных и грамотрицательных бактерий (кокков и бацилл). Имипенем также может быть использован против *Mycobacterium* spp., но не обладает активностью против *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp., *Legionella* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Burkholderia* spp., *Clostridium difficile*, а также метициллиноустойчивых *Staphylococcus aureus* (MRSA) [1–3].

Механизмы устойчивости бактерий к имипенему

Модификация пориновых каналов. В норме, для взаимодействия с мишенью, беталактамы антибиотики свободно проникают через белковые каналы внешней мембраны грамотрицательных бактерий, называемые поринами или пориновыми каналами. Дефект порина может привести к неспособности антимикробного агента проникнуть внутрь клетки и, как следствие, обеспечивает устойчивость штамма. Мутации в структуре порина OprD вместе с продукцией гена *AmpC* являются причиной устойчивости к имипенему у *Pseudomonas aeruginosa*. Также дефекты OprD формируют устойчивость у *Klebsiella* spp.

Активное выведение из клетки (эффлюкс). Известны, как минимум, 4 больших семейства транспортных систем, обеспечивающих активное выведение экзогенных веществ из клетки. «Базовая» активность данных систем во многом определяет уровень природной чувствительности бактерий к антимикробным препаратам. Они играют значительную роль в природной и приобретённой устойчивости к антибиотикам у *P. aeruginosa*. Самая распространённая система MexAB-OprM обеспечивает устойчивость к меропенему, но она не эффективна по отношению к имипенему. Гиперэкспрессия генов *MexAB-OprM* может быть ответом на применение антибиотиков, что приводит к неэффективности применяемых препаратов. Кроме устойчивости к меропенему, продукция генов пориновых каналов обеспечивает клеткам патогенов устойчивость к другим антибиотикам, таким как: фторхинолоны, пенициллины, цефалоспорины, макролиды и сульфаниламиды. Таким образом, индукция эффлюксных систем может быстро привести к неэффективности применения фторхинолонов и большинства беталактамов у группы *Pseudomonas*, но при этом будет сохраняться чувствительность к имипенему и аминогликозидам.

Продукция β -лактамаз. Продукция β -лактамаз — самый распространённый механизм устойчивости к беталактамам антибиотикам. С формальной точки зрения β -лактамазы относятся к протеазам. Механизм действия беталактаменных антибиотиков заключается в связывании с транспептидазами клетки, или как их ещё называют, пенициллинсвязывающими белками (ПСБ), которые необходимы при синтезе пептидогликана — главного компонента клеточной стенки бактерий. Ферменты группы β -лактамаз обладают сродством к беталактамам антибиотикам подобно ПСБ, но их взаимодействие с антибиотиком приводит к разрыву пептидной связи, что переводит беталактамы в неактивное состояние. Комплексы, образуемые β -лактамазами и беталактаменными антибиотиками не стабильны, что позволяет одной молекуле β -лактамазы гидролизовать множество молекул антибиотика.

В 1980 году (этот же год считается годом появления имипенема) были описаны β -лактамазы расширенного спектра действия — БЛРС (Extended-spectrum β -lactamases, ESBLs). Ферменты этой группы относятся к молекулярному классу А и по функциональной классификации относятся к группе 2be. В группу 2be входят многочисленные мутанты β -лактамаз типа TEM и SHV. Появление дополнительных мутаций привело к тому, что, наряду с пенициллинами, они стали эффективно расщеплять и цефалоспорины I–IV поколений. К этой же группе относятся многочисленные β -лактамазы типа CTX-M. Характерной особенностью ферментов последнего типа является их высокая гидролизующая активность в отношении цефотаксима и низкая — в отношении цефтазидима. Но по отношению к антибиотикам группы карбапенемов, включая имипенем, эти ферменты не активны.

В 1990 году были описаны первые карбапенемазы — ферменты, способные гидролизовать карбапенемные антибиотики. На примере официальных данных США (National Nosocomial Infection Surveillance) за 1986–1990 гг. среди возбудителей нозокомиальных инфекций семейства Enterobacteriaceae только 2,3% были нечувствительными к имипенему. На сегодняшний день распространение карбапенемаз является угрозой для возможности эффективного применения беталактаменных антибиотиков. Ферменты данной группы гидролизуют все беталактаменные антибиотики, хотя есть исключения, например, фермент NDM-1, о котором подробнее будет написано ниже, не гидролизует азтреонам, но его клиническая эффективность не высока в связи с возможным присутствием в большом количестве случаев также и других β -лактамаз в одном изоляте.

Существует две классификации β -лактамаз: функциональная, основанная на субстратной специфичности, и молекулярная, основанная на

первичной аминокислотной структуре и структуре активного центра ферментов. По структуре первичной аминокислотной последовательности β -лактамазы разделяют на группы А, В, С, и D, причём группы А, В и С являются протеазами серинового типа, а группа D в активном центре содержит один или два атома цинка, в связи с чем их ещё называют металло- β -лактамазами (МБЛ). Способностью гидролизовать карбапенемы, включая имипенем, обладают представители разных молекулярных классов этих ферментов.

Представители молекулярного класса А подавляются клавуланатом, некоторые из них не разрушают цефалоспорины III поколения и азтреонам. Есть представители, кодируемые на хромосомах и с плазмидной локализацией. Наибольшую угрозу представляют ферменты плазмидной локализации, которая обеспечивает быстрое распространение генов резистентности. Карбапенемазной активностью обладает также фермент КРС, описанный в 1996 году, но пока сообщений о его описании в России нет.

Молекулярный класс D характеризуется слабой чувствительностью к клавуланату и ЭДТА. β -Лактамазы этого класса также могут быть локализованы на хромосоме или иметь плазмидную локализацию. Группа ферментов ОХА-51 — кодируются на хромосоме и видоспецифичны для *Acinetobacter* spp.; ОХА-23, ОХА-40 и ОХА-58 имеют плазмидную локализацию и также преимущественно характерны для *Acinetobacter* spp. Группа ОХА-48 характерна для семейства Enterobacteriaceae и имеет плазмидную локализацию. Фермент ОХА-48 и его модификация — ОХА-181 представляют одну из основных угроз, с которой связывают распространение устойчивости к карбапенемам.

Первый приобретённый фермент молекулярного класса В — металло- β -лактамазы (МБЛ) описан у *Pseudomonas aeruginosa* в 1991 году в Японии [4]. С тех пор МБЛ получили распространение по всему миру. Наиболее значимыми ферментами этой группы являются IMP, VIM и NDM. Они гидролизуют все беталактамы, за исключением азтреонама. Их активность ингибируется ЭДТА, но не клавуланатом. Смертность от инфекций, связанных с продукцией МБЛ, составляет, по данным многих авторов, от 18 до 67% [5–8]. Наибольшее внимание уделяется ферменту NDM-1 (New-Delphi-metallo- β -lactamase). Первое описание этого фермента было в 2009 году и с тех пор он описан во всех странах, за редким исключением. В 2012 году также он описан и в России [9].

Фармакокинетика и фармакодинамика имипенема

Применение имипенема для лечения взрослых, детей, пациентов с заболеванием почек и

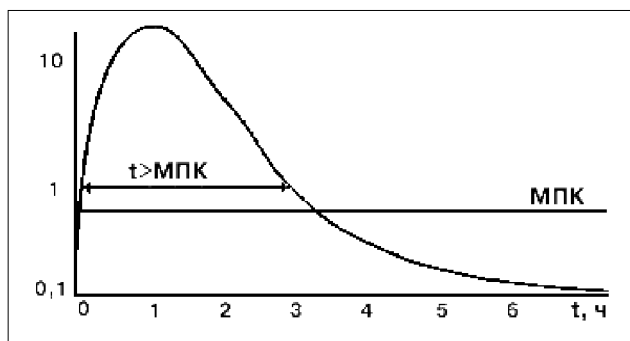


Рис. 2. Фармакодинамические основы дозирования карбапенемов.

людей пожилого возраста хорошо изучено. Следует заметить, что часто используемые в практике дозировки 4×500 мг. и 3×1000 мг. подобраны приблизительно, на основании времени (t) поддержания уровня имипенема в сыворотке крови выше минимальной подавляющей концентрации — $t > \text{MPC}$ [10]. Известно, что бактерицидное действие карбапенемов зависит не от максимальной концентрации (C_{max}) их в сыворотке крови, а от длительности периода поддержания уровня концентрации выше минимальной подавляющей концентрации (МПК) для данного возбудителя. Поэтому для получения антибактериального эффекта достаточно поддержания C_{max} на уровне 2–4-кратных значений МПК (рис. 2).

Пациентам с клиренсом креатинина 70 мл/мин/1,73 м² и/или массой тела менее 70 кг требуется снижение дозировки. Для детей в возрасте 3 мес и более рекомендуемая доза составляет 15–25 мг/кг каждые 6 ч.

Фармакокинетика имипенема изучена хорошо. Внутривенное введение имипенема в течение 20 мин приводит к пиковым уровням вещества в плазме крови в зависимости от дозировки: 14–24 мг/л (доза на 250 мг), 21–58 мг/л (доза 500 мг) и 41–83 мг/л (доза 1000 мг). При всех вышеописанных дозировках уровни имипенема в плазме крови после 4–6 ч уменьшаются до <1 мг/л. Снижение концентрации в плазме вдвое происходит примерно через 1 час. Средняя концентрация имипенема через 1 час после введения составляет 5,6 мг/кг в лёгочной ткани, 11,1 мг/кг — в тканях эндометрия, 22 мг/л — в плевральной жидкости, 2,6 мг/л — в цереброспинальной жидкости и 16,4 мг/л — в интерстициальной жидкости. Совместное применение с пробенецидом увеличивает период полувыведения и концентрацию имипенема в сыворотке крови. Приблизительно 10–20% имипенема связывается с белками сыворотки крови. Из организма имипенем выводится с мочой, около 70% — в течение 10 ч и затем более почками не экскретируется. В плазме или моче не накапливается, распределяется экстенсивно в тканях и жидкостях организма [11, 12]. Бактери-

цидное действие имипенема развивается при концентрациях, превышающих его МПК, при этом дальнейшее повышение концентрации препарата не приводит к увеличению гибели микроорганизмов.

Важным условием для проявления бактерицидного действия имипенема является поддержание его концентраций на уровне, превышающим значения МПК, поэтому при применении имипенема более важное значение имеет не величина разовой дозы, а кратность введения препарата. В экспериментальных и клинических исследованиях установлено, что адекватный клинический и бактериологический эффекты при применении имипенема могут быть достигнуты, если концентрации в крови превышают значения МПК в течение 50% временного интервала между введениями препарата [13, 14].

Фармакокинетические параметры имипенема и меропенема (по 1 г препарата в виде 30-минутной инфузии) сравнивали у 20 пациентов с сепсисом, находившихся в критическом состоянии [15]. Максимальная концентрация имипенема в сыворотке ($C_{\max}$) была значительно выше, чем концентрация меропенема (90,1–50,9 против 46,6–14,6 мг/л, $p < 0,01$), у имипенема в сравнении с меропенемом была также существенно выше площадь под фармакокинетической кривой. У меропенема был выше объём распределения и клиренс. Было также показано, что концентрация имипенема в сыворотке крови в течение 8 ч превосходит 4,0 мкг/мл, а меропенема — только 2,0 мкг/мл. Авторы пришли к заключению, что дозы обоих карбапенемов не были эквивалентны у пациентов с сепсисом. Необходимы дальнейшие исследования, которые покажут, действительно ли фармакокинетический профиль имипенема более благоприятный, в то время как в исследованиях *in vitro* показатели меропенема в отношении грамотрицательных бактерий немного лучше.

В другом, недавно опубликованном исследовании, было проведено сравнение фармакокинетических показателей имипенема и меропенема при применении одинаковых доз каждого препарата (250, 500 и 1000 мг каждые 6 ч и каждые 8 ч) и времени введения (инфузия 30 мин) [16]. Имипенем достигал фармакодинамической цели чаще, чем меропенем (58,3–99,2% для имипенема против 46,9–99% для меропенема), хотя статистически значимые различия отмечены не были. В исследовании проводили инфузии в течение 3 часов, чтобы оптимизировать эффективность меропенема, увеличивая $t > MIC$, поскольку известно, что нахождение препарата при комнатной температуре около 4 часов, ведет к уменьшению его эффективности [17, 18]. Исследования, в которых изучалась 3-часовая инфузия различных доз имипенема и меропенема, показали отсутствие различий между ними в способности достигать фармакодинамической цели [19]. Несмотря на то, что имипенем и меропенем должны проявлять аналогичную эффективность во время 3-часовых инфузий, исследование показало необходимость в более высоких дозировках меропенема для достижения терапевтического эффекта. Обнаружено, что для меропенема необходима инфузия в течение 3 часов для получения такой же эффективности, которая достигается имипенемом в аналогичной дозе уже за 1 час. Другими словами, чтобы достигнуть терапевтической эффективности меропенема для пациентов необходимо обеспечить более высокую дозу или более длительное время его инфузии. Это было описано в общих чертах в обзоре литературы, авторы которого предположили, что введение меропенема по 500 мг каждые 8 ч в течение 30 мин дает намного более низкую вероятность достижения — 40% для $t > MIC$ по отношению к *P.aeruginosa* (72,5%), чем при такой же дозировке и интервале введения в течение 3 ч (87,9%) или 1000 мг каждые 8 ч в течение 30 мин (93,4%). Высказано мнение, что фармакокинетика меропенема нуждается в оптимизации для достижения критического уровня $t > MIC$ [20].

Безопасность и переносимость

Высокий уровень безопасности имипенема не вызывает сомнений после 35 лет многочисленных исследований и 26 лет опыта клинического применения у 30 млн пациентов более чем в 100 странах мира. Серьёзные побочные эффекты проявляются редко. Наиболее распространённые из них наблюдались примерно у 1% пациентов в клинических испытаниях и выражались флебитами / тромбофлебитами (3,1%), тошнотой (2,0%), диареей (1,8%) и рвотой (1,5%). Препарат не обладает нефротоксическим эффектом. Частота развития судорожного синдрома была одинакова, как при условии применения имипенема, так и меропенема [21]. При применении имипенема чаще (по сравнению с меропенемом) наблюдается развитие приступов тошноты, но снижение выраженности этого нежелательного явления может быть достигнуто путём уменьшения скорости инфузии препарата. Кроме того, в клинических исследованиях доказана безопасность применения имипенема даже у беременных женщин, детей раннего возраста и пожилых людей [22].

Имипенем не показан при заболеваниях центральной нервной системы, поскольку считается, что он обладает судорожной активностью [23–26]. Для выявления риска развития и установления достоверных случаев эпилептических припадков, вызванных применением имипенема, был проведён мета-анализ публикаций, описывающих при-

менение имипенема с 1984 по 1999 гг. Среди 5761 взрослых пациентов, находившихся на лечении имипенемом, у 81 (1,4%) были зарегистрированы случаи возникновения эпилептических припадков. В сравнительных исследованиях имипенема и меропенема ($n=200$ и $n=232$ соответственно), не было зарегистрировано ни одного случая возникновения эпилептических припадков [27, 28]. Было доказано, что наличие таких предрасполагающих к развитию эпилептических припадков факторов, как дисфункция почек, единичные случаи припадков в анамнезе, метаболические нарушения, гипоксия, и прекращение применения Фенитоина, увеличивает риск развития эпилепсии на фоне приёма имипенема. Таким образом, использование адекватных доз имипенема, при необходимости его применения, в значительной степени снижает риск развития эпилептических припадков [29].

Дозы имипенема должны быть скорректированы в отношении пациентов с любыми функциональными нарушениями мочевыводящей системы. При отсутствии такой корректировки риск развития эпилептических припадков возрастает. Возможно, что сопутствующий приём лекарственных средств с нейротоксическими профилями, таких как теофиллин, ведет к передозировке и может способствовать риску развития эпилептических припадков. У пациентов с нормальной функцией почек максимальный однократный приём имипенема не может превышать 50 мг/кг в день или 4 г в день с последующим снижением дозы.

Имипенем не следует применять совместно с ганцикловиром, поскольку были сообщения о развитии эпилептических припадков у пациентов, применяющих оба этих лекарственных препарата одновременно. Имипенем не должен также применяться в растворе с другими антибиотиками, хотя, при необходимости, возможно его сочетание с аминогликозидами [27–29].

Место имипенема и других карбапенемов в антибактериальной терапии

В связи с появлением в последние годы ряда новых карбапенемов возникла необходимость в их дифференцировке по спектру активности и месту в системе антибактериальной терапии. R. Shah и R. D. Isaacs [30] в 2003 году предложили разделить карбапенемы на три группы. К первой группе авторы отнесли эртапенем, отличающийся от карбапенемов второй группы отсутствием активности в отношении грамотрицательных «неферментирующих» бактерий, прежде всего *P.aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. Из карбапенемов, доступных в России, ко второй группе относятся имипенем, меропенем и дорипенем. К третьей группе авторы отнесли различ-

ные экспериментальные соединения, например обладающие активностью в отношении MRSA.

Для практики особое значение имеет выделение двух первых групп. Препараты первой группы предназначены, в основном, для лечения тяжёлых внебольничных инфекций. С этой точки зрения крайне важна их устойчивость к БЛРС, которые в настоящее время выходят из госпитальной среды во внебольничную. При этом отсутствие активности в отношении неферментирующих бактерий рассматривается как положительный факт. Предполагается, что широкое применение карбапенемов первой группы (эртапенема) не будет способствовать селекции устойчивости среди *P.aeruginosa* и *Acinetobacter* spp.

Карбапенемы второй группы однозначно позиционируются для лечения тяжёлых госпитальных инфекций, в том числе и вызванных множественноустойчивыми патогенами. По уровню антимикробной активности антибиотики этой группы сходны, различия между ними незначительны и хорошо известны. Так, имипенем отличается несколько большей активностью в отношении грамположительных бактерий, а меропенем и дорипенем — в отношении грамотрицательных. С клинической точки зрения области применения этих карбапенемов также во многом сходны. Общим свойством всех карбапенемов является высокая эффективность при тяжёлых инфекциях, вызванных грамотрицательными бактериями — продуцентами БЛРС [31, 32]. При назначении карбапенемов в течение первых 5 дней у пациентов с бактериемиями, обусловленными БЛРС-продуцирующими *K.pneumoniae*, уровень смертности составил 5% по сравнению с 43% в случае применения любых других антибиотиков ($p=0,01$) [31]. Однако вопрос о сравнительной оценке эффективности карбапенемов изучен явно недостаточно.

Наиболее полно клиническая и бактериологическая эффективность документирована для имипенема. К основным показаниям для применения имипенема относятся: вентилятор-ассоциированные пневмонии (ВАП), госпитальные пневмонии, интраабдоминальные инфекции, инфекции мочевыводящих путей, кожи и мягких тканей, фебрильная нейтропения и эндокардит. В последнее десятилетие имипенем является стандартным препаратом сравнения в клинических испытаниях многих новых антибактериальных препаратов [34–36]. В подавляющем большинстве случаев имипенем демонстрирует клиническую эффективность, сопоставимую с препаратами сравнения. Определённый интерес представляют результаты сопоставления эффективности имипенема и дорипенема. При сравнении эффективности при ВАП 10-дневного курса имипенема и 7-дневного курса дорипенема была выявлена статистически незначимая тенденция в

пользу большей эффективности имипенема. Не ясно связаны ли выявленные различия с более длительным курсом применения имипенема или с другими причинами [37].

При тяжёлых инфекциях, особенно при сепсисе своевременное назначение адекватной антибактериальной терапии (антибиотиков, перекрывающих весь спектр этиологических агентов) имеет критическое значение, задержка с таким назначением приводит к существенному ухудшению результатов лечения, в том числе и к увеличению частоты летальных исходов [33, 38–40]. В связи с ограниченными возможностями микробиологической диагностики антибиотиков в таких случаях приходится назначать эмпирически используя стратегию «деэскалации». Деэскалационный подход заключается в назначении комбинации антибактериальных препаратов, обладающих максимально широким спектром активности и способностью преодолевать ведущие механизмы резистентности, в дальнейшем при получении данных об этиологии инфекции и антибиотикочувствительности возбудителей производится коррективная терапия в сторону сужения спектра. Одним из наиболее распростра-

нённых вариантов стартовой терапии при крайне тяжёлых инфекциях неясной этиологии является комбинация карбапенемов (имипенема) с гликопептидами (ванкомицином), иногда в комбинацию включают и антифунгальные препараты.

В заключение следует отметить, что имипенем относится к немногим антибактериальным препаратам, сохраняющим клиническое значение более 30 лет, несмотря на формирование и распространение разнообразных механизмов резистентности. Есть все основания полагать, что при его разумном использовании имипенем ещё долго будет оставаться в арсенале современной медицины.

В последнее время на фармацевтическом рынке Российской Федерации появляются генерики многих хорошо известных антибиотиков, это касается и такого высокотехнологичного препарата как имипенем. Антибиотики генерики существенно расширяют возможности лечебных учреждений по лечению широкого круга инфекций. С этой точки зрения определённый интерес представляет один из таких генериков имипенема — Циласпен (производства Сандживани Парантерал Лимитед, Индия).

ЛИТЕРАТУРА

1. Rodloff A. C., Goldstein E. J. C., Torres A. Two decades of imipenem therapy. *J of Antim Chem* 2006; 58: 916–929.
2. Birnbaum J., Kahan F.M., Kropp H. et al. Carbapenems, a new class of β -lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am J Med* 1985; 78: 3–21.
3. Kropp H., Gerckens L., Sundelof J.G. et al. Antibacterial activity of imipenem: the first thienamycin antibiotic. *Rev Infect Dis* 1985; 7 Suppl 3: S389–410.
4. Watanabe M., Iyobe S., Inoue M., Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 147–151.
5. Senda K., Arakawa Y., Nakashima K., Ito H., Ichiyama S., Shimokata K., Kato N., Ohta M. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 349–353.
6. Pournaras S., Maniati M., Petinaki E., Tzouveleakis L.S., Tsakris A., Legakis N.J., Maniatis A.N. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo- β -lactamase gene variants blaVIM-2 and blaVIM-4. *Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1409–1414.
7. Livermore, D. M., Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 489–495.
8. Hota S., Hirji Z., Stockton K. et al. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Inf Control Hosp Epid* 2009; 30: 1.
9. Гостев В.В., Сидоренко С.В. SCCmec кассеты, эволюция и генетические линии метициллинорезистентных золотистых стафилококков. *Антибиотики и химиотер* 2012; 9–10: 39–46.
10. Mouton R.P., Towner D.J., Horrevorts A.M. et al. Comparative pharmacokinetics of the carbapenems: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 2000; 39: 185–201.
11. Balfour J., Bryson H., Brogden R. Imipenem/cilastatin. An update of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in the treatment of serious infections. *Drugs* 1996; 51: 99–136.
12. Lavan G., Nord C. Adverse effects of monobactams and carbapenems. *Drug Safety* 1995; 12: 305–13.
13. Drusano G.L., Craig W.A. Relevance of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the selection of antibiotics for respiratory tract infections. *Chemotherapy* 1997; 9 Suppl 3: 38–44.
14. Яковлев С.В. Имипенем. Оценка роли препарата при антибактериальной терапии тяжёлых госпитальных инфекций. *Антибиотики и химиотер* 1999; 5: 33–37.
15. Novelli A., Adembri C., Livi P. et al. Pharmacokinetic evaluation of meropenem and imipenem in critically ill patients with sepsis. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44: 539–549.
16. Lee L.S., Bertino J.S. Jr. Comparison of imipenem/cilastatin and meropenem attainment of pharmacodynamic target goals at various dosage regimens using a short infusion time (30 minutes). *Clin Pharmacol Therapeut* 2004; 75: 14.
17. Kuti J.L., Dandekar P.K., Nightingale C.H. et al. Use of Monte Carlo simulation to design an optimized pharmacodynamic dosing strategy for meropenem. *J Clin Pharmacol* 2003; 43: 1116–23.
18. Dandekar P.K., Maglio D., Sutherland C.A. et al. Pharmacokinetics of meropenem 0.5 and 2 g every 8 hours as a 3 hour infusion. *Pharmacotherapy* 2003; 23: 988–991.
19. Lee L.S., Bertino J.S. Jr. Use of a prolonged infusion time (3 hours) in attaining pharmacodynamic target goals of imipenem-cilastatin and meropenem at various dosing regimens. *Clin Pharmacol Therapeut* 2004; 75: P15.
20. Mattoes H., Kuti J.L., Drusano G.L. et al. Optimizing antimicrobial pharmacodynamics: dosage strategies for meropenem. *Clin Ther* 2004; 26: 1187–1198.
21. Benfield P., Chrisp P. Imipenem/cilastatin: a pharmacoeconomic appraisal of its use in intraabdominal infections. *Pharmacoeconomics* 1992; 1: 443–459.
22. Balfour J.A., Bryson H.M., Brogden R.N. Imipenem/cilastatin. An update of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in the treatment of serious infections. *Drugs* 1996; 51: 1: 99–136.
23. Calandra G.B., Wang C., Aziz M. et al. The safety profile of imipenem/cilastatin: worldwide clinical experience based on 3470 patients. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18: Suppl E: 193–202.
24. Pestotnik S., Classen D.C., Evans R.S. et al. Prospective surveillance of imipenem/cilastatin use and associated seizures using a hospital information system. *Ann Pharmacother* 1993; 27: 497–501.
25. Day I.P., Goudie J., Nishiki K. et al. Correlation between *in vitro* and *in vivo* models of proconvulsive activity with the carbapenem antibiotics,

- biapenem, imipenem/cilastatin, and meropenem. *Toxicol Lett* 1995; 76: 239—243.
26. *Norrby S.R.* Neurotoxicity of carbapenem antibacterials. *Drug Saf* 1996; 15: 87—90.
 27. *Basoli A., Zarba E.Z., Mazzocchi P. et al.* Imipenem/cilastatin (1.5 g daily) versus meropenem (3.0 g daily) in patients with intra-abdominal infections: results of a prospective, randomized, multicentre trial. *Scand J Infect Dis* 1997; 29: 503—508.
 28. *Geroulanos S.* Meropenem versus imipenem/cilastatin in intra-abdominal infections requiring surgery. *Antimicrob Chemotherapy* 1995; 36 Suppl A: 195—205.
 29. *Koppel B., Hauser W.A., Politis C. et al.* Seizures in the critically ill: the role of imipenem. *Epilepsia* 2004; 42: 1590—1593.
 30. *Shah P., Isaacs R.D.* Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. *J Antimicrob Chemotherapy* 2003; 52: 538—542.
 31. *Paterson D., Ko W.-C., Von Gottberg A. et al.* International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum β -lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med* 2004; 140: 26—32.
 32. *Vardakas K. Z., Tansarli G.S., Rafailidis P.I., Falagas M.E.* Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases: a systematic review and meta-analysis. *JAC* 2012; 67: 2793—2803.
 33. *Ibrahim E., Sherman G., Ward S. et al.* The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000; 118: 146—155.
 34. *West M., Boulanger B.R., Fogarty C. et al.* Levofloxacin compared with imipenem/cilastatin followed by ciprofloxacin in adult patients with nosocomial pneumonia: a multicenter, prospective, randomized, open-label study. *Clin Ther* 2003; 2592: 485—506.
 35. *Cherif H., Bjorkholm M., Engervall P. et al.* A prospective, randomized study comparing cefepime and imipenem-cilastatin in the empirical treatment of febrile neutropenia in patients treated for haematological malignancies. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 593—600.
 36. *Eraso A.A., Crisostomo A.C., Yan L.N. et al.* Randomized comparison of piperacillin/tazobactam versus imipenem/cilastatin in the treatment of patients with intra-abdominal infection. *Asian J Surg* 2004; 27: 227—235.
 37. *Kollef M.H. et al.* A randomized trial of 7-day doripenem versus 10-day imipenem-cilastatin for ventilator-associated pneumonia. *Critical Care* 2012, 16: R218.
 38. *Kollef M.H., Sherman G., Ward S. et al.* Inadequate antimicrobial treatment of infections. A risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 1999; 115: 462—474.
 39. *Valles J., Rello J., Ochagavia A. et al.* Community-acquired bloodstream infection in critically ill adult patients. Impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest* 2003; 123: 1615—1624.
 40. *Garnacho-Montero J., Garcia-Garmendia J.L., Barrero-Almodovar A. et al.* Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the Intensive Care Unit with sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31: 2742—2751.

**ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
ЦЕЛОГО ГЕНОМА КАК АЛЬТЕРНАТИВА
ТЕСТИРОВАНИЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
К АНТИБИОТИКАМ ПО ФЕНОТИПУ.**

**GENOTYPING USING WHOLE-GENOME SEQUENCING
IS A REALISTIC ALTERNATIVE TO SURVEILLANCE BASED
ON PHENOTYPIC ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TEST-
ING / E. ZANKARI, H. HASMAN, R. S. KAAS,
A. M. SEYFARTH, Y. AGERSØ, O. LUND, M. V. LARSEN, F.
M. AARESTRUP* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL
CHEMOTHERAPY 2013; 68: 4: 771–777.**

Тестирование чувствительности важно для постановки клинического диагноза, чтобы определить эмпирическую терапию и возможные проблемы. Принятые процедуры фенотипирования иногда сопровождаются ошибками и нуждается в последующем генотипировании. Секвенирование целого генома (СЦГ) вскоре может стать рутинным методом для мониторинга и клинической диагностики. Задачей исследования было сравнить в качестве рутинного метода контроля антибиотикоустойчивости и методы СЦГ и общепринятое фенотипирование. Была определена чувствительность к антибиотикам у 200 выделенных от датских свиней штаммов, охватывающих 4 бактериальных вида. Геномная ДНК всех штаммов, выделенная и очищенная, была секвенирована в виде спаренных концов на Illumina платформе. Для идентификации приобретённых генов устойчивости и типов MLST (типирование мультилокусным секвенированием) использовали web-серверы ResFinder и MLST. Результаты по ResFinder сравнивали с результатами фенотипического тестирования антибиотикочувствительности, используя значения предельных эпидемиологических концентраций по EUCAST (European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing) и типы MLST. Всего был выполнен 3051 фенотипический тест, согласно которому 482 штамма были определены как устойчивые и 2569 — как чувствительные. Было установлено 7 различий между тестированием и прогнозируемой чувствительностью по СЦГ, все они касались устойчивости *Escherichia coli* к спектиномицину. У *Salmonella typhimurium* наблюдалась корреляция между MLST типом и профилем устойчивости: штаммы, принадлежащие к сиквенс-типу (ST) 34 были более устойчивы, чем ST 19 штаммы. Итак, между фенотипическим и прогностическим (СЦГ) методами определения антибиотикочувствительности наблюдалась высокая степень согласованности (99,74%), и тестирование устойчивости к антибиотикам по СЦГ может рассматриваться как альтернатива общепринятому фенотипическому методу.

* National Food Institute, Technical University of Denmark, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark.

**СПЕКТР И АКТИВНОСТЬ ЦЕФТАРОЛИНА
В ОТНОШЕНИИ ОСНОВНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ИНФЕКЦИЙ КОЖИ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ
В ЕВРОПЕ (2010).**

**SPECTRUM AND POTENCY OF CEFTAROLINE TESTED
AGAINST LEADING PATHOGENS CAUSING SKIN
AND SOFT-TISSUE INFECTIONS IN EUROPE (2010)/
D. J. FARRELL, R. K. FLAMM, H. S. SADER*,
R. N. JONES // INTERNATIONAL JOURNAL
OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2013; 41: 4: 337–342.**

Цефтаролин, активный метаболит пролекарства — цефтаролина фосамил, новый цефалоспориin с *in vitro* бактерицидной активностью в отношении грамположительных микроорганизмов, в т. ч. метициллиночувствительных *Staphylococcus aureus* (MSSA), метициллиноустойчивых *S. aureus* (MRSA), β -гемолитических стрептококков, стрептококков группы *viridans* (VGS), *Streptococcus pneumoniae*, а также в отношении многих обычных грамотрицательных микроорганизмов. Был определён спектр и активность цефтаролина в отношении основных возбудителей осложнённых инфекций кожи и мягких тканей (оИКМТ), выделенных в Европе в течение 2010 г. По программе AWARE (Assessing Worldwide Antimicrobial Resistance and Evaluation) в качестве возбудителей оИКМТ в целом было идентифицировано 2438 штаммов, полученных от больных в 52 медицинских центрах 19 европейских стран. Тестирование чувствительности к цефтаролину и антибиотикам сравнения было выполнено референс-методом микроразведений в бульоне. Отмечена активность в отношении MRSA штаммов (МПК_{50/90} = 1/2 мг/л), но она была ниже, чем в отношении MSSA (МПК_{50/90} = 0,25/0,25 мг/л). Цефтаролин продемонстрировал высокую активность в отношении всех штаммов *S. aureus* (МПК_{50/90} = 1/2 мг/л), подавление 100% штаммов наблюдали при МПК₅₀ ≤ 2 мг/л. Цефтаролин был также высокоактивен в отношении 460 штаммов β -гемолитических стрептококков и 93 штаммов VGS (МПК₉₀ = 0,015 мг/л и 0,06 мг/л соответственно). Активность цефтаролина в отношении штаммов *Escherichia coli* (МПК₅₀ = 0,12 мг/л) и *Klebsiella pneumoniae* (МПК₅₀ = 0,06 мг/л), не образующих бета-лактамазы расширенного спектра, была сходна с активностью цефтриаксона и цефтазидима. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой *in vitro* активности цефтаролина в отношении выделенных за последнее время в европейских больницах возбудителей оИКМТ.

* JMI Laboratories, 345 Beaver Creek Center, Suite A, North Liberty, IA 52317, USA.

АКТИВНОСТЬ ЦЕФТАРОЛИНА В ОТНОШЕНИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ (БУЛЬОН) И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ (ТНР-1 МОНОЦИТЫ) ФОРМ МЕТИЦИЛЛИНОУСТОЙЧИВЫХ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*: СРАВНЕНИЕ С ВАНКОМИЦИНОМ, ЛИНЕЗОЛИДОМ И ДАПТОМИЦИНОМ.

ACTIVITY OF CEFTAROLINE AGAINST EXTRACELLULAR (BROTH) AND INTRACELLULAR (TNR-1 MONOCYTES) FORMS OF METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*: COMPARISON WITH VANCOMYCIN, LINEZOLID AND DAPTOMYCIN/A. MÉLARD, L. G. GARCIA, D. DAS, R. ROZENBERG, P. M. TULKENS*, F. VAN BAMBEKE, S. LEMAIRE // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 3: 648—658.

Цефтаролина фосамил показан при лечении острых бактериальных инфекций кожи и мягких тканей, обусловленных метициллиноустойчивыми *Staphylococcus aureus* (MRSA). Определяли сравнительную активность цефтаролина (активный метаболит) и ванкомицина, даптомицина, линезолида в отношении внутриклеточных форм *S. aureus*. Были исследованы два штамма метициллиночувствительного *S. aureus* (MSSA) и 11 MRSA штаммов с МПК цефтаролина 0,125—2 мг/л (2 штамма ванкомицино- и 1 штамм линезолидоустойчивые, согласно критериям EUCAST; VISA и *cfr*+). Активность в зависимости от концентрации (24 час. инкубация) измеряли в бульоне и после фагоцитоза ТНР-1 моноцитов и определяли 1) относительную активность (EC_{50}) и статические концентрации (C_{ss}) (мг/л и $\times$ МПК), 2) относительную активность у человека C_{max} (E_{Cmax}) и максимальную относительную эффективность (E_{max}) (изменение $\log_{10}$ КОЕ по сравнению с исходным инокуломом). Стабильность и аккумуляцию цефтаролина в клетках измеряли спектрометрически. Как в бульоне, так и в моноцитах цефтаролин показал сходную активность с ванкомицином, даптомицином и линезолидом, независимо от механизмов устойчивости к ванкомицину и линезолиду. Значения E_{Cmax} и E_{max} всех 4-х антибиотиков внутри клетки были значительно ниже, чем в бульоне (снижение КОЕ на 0,5 $\log_{10}$ против 4—5 $\log_{10}$), но EC_{50} и C_{ss} показали сравнительно небольшое изменение (все значения были в пределах 0,3—6 $\times$ МПК). Среднее отношение внутри- и внеклеточных концентраций цефтаролина (20 мг/л; 24 час) составляло 0,66 $\pm$ 0,06 и 0,90 $\pm$ 0,36 у неинфицированных и инфицированных клеток соответственно. Таким образом, *in vitro* цефтаролин контролирует рост MRSA внутри клеток в той же степени, что и ванкомицин, линезолид и даптомицин, если значения МПК цефтаролина $\leq$ 2 мг/л.

* Pharmacologie cellulaire et moléculaire, Université catholique de Louvain, Avenue E. Mounier 73 B1.73.05, B-1200 Brussels, Belgium.

АКТИВНОСТЬ НОВОГО ЦЕФАЛОСПОРИНА ЦЕФТОЛОЗАНА, ОДНОГО И С ТАЗОБАКТАМОМ, В ОТНОШЕНИИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* И ENTEROBACTERIACEAE, ВКЛЮЧАЯ ШТАММЫ-ПРОДУЦЕНТЫ БЕТА-ЛАКТАМАЗ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА, НА МОДЕЛИ ИНФЕКЦИИ БЕДРА У НЕЙТРОПЕНИЧЕСКИХ МЫШЕЙ.

IN VIVO ACTIVITIES OF CEFTOLOZANE, A NEW CEPHALOSPORIN, WITH AND WITHOUT TAZOBACTAM AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND ENTEROBACTERIACEAE, INCLUDING STRAINS WITH EXTENDED-SPECTRUM β -LACTAMASES, IN THE THIGHS OF NEUTROPENIC MICE / W. A. CRAIG*, D. R. ANDES // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2013; 57: 4: 1577—1582.

Цефтолозан, новый цефалоспорин, высокоактивен в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и Enterobacteriaceae. На модели инфекции бедра нейтропенической мыши определяли фармакокинетический/фармакодинамический индекс и эффективность цефтолозана в отношении грамотрицательных бактерий, сравнивали *in vivo* скорость гибели *P. aeruginosa* под действием цефтолозана и цефтазидима, а также активность различных соотношений цефтолозана и тазобактама в комбинации при действии на штаммы Enterobacteriaceae, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС). Нейтропенических мышей с бактериальной нагрузкой 10^{6,2–7,1} КОЕ/бедро лечили в течение 24 ч: 1) 2 штамма Enterobacteriaceae — различными дозами (3,12—1600 мг/кг) и с различными интервалами дозирования (3, 6, 12 и 24 ч), 2) 4 штамма Enterobacteriaceae и 4 штамма *P. aeruginosa* — дозами 0,39—800 мг/кг каждые 6 час, 3) 5 штаммов Enterobacteriaceae, образующих БЛРС, — дозами 400 и 800 мг/кг цефтолозана + тазобактама в соотношении 2:1, 4:1 и 8:1. Фармакокинетика цефтолозана в дозах 25, 100 и 400 мг/кг носила линейный характер, и значение соотношения пик/доза составляло от 1,0 до 1,4; период полувыведения составил 12—14 мин. Основным показателем эффективности был индекс Т>МПК. При стазе (stasis) (гибель на 1 log) значение Т>МПК составляло 26,3 $\pm$ 2,1% (31,6 $\pm$ 1,6%) для штаммов Enterobacteriaceae дикого типа; 31,1 $\pm$ 4,9% (34,8 $\pm$ 4,4%) для Enterobacteriaceae с БЛРС и 24,0 $\pm$ 3,3% (31,5 $\pm$ 3,9%) для *P. aeruginosa*. При дозировании 200 мг/кг каждые 6 час. скорость гибели клеток *P. aeruginosa* под действием цефтолозана была выше по сравнению с цефтазидимом (–0,34 до –0,41 $\log_{10}$ КОЕ/бедро/час против –0,21 до –0,24 $\log_{10}$ КОЕ/бедро/час). Соотношение цефтолозана и тазобактама в самой высокоактивной комбинации было равно 2:1. Величина Т>МПК для цефтолозана была меньше, чем у

других цефалоспоринов, что может быть обусловлено более высокой скоростью гибели бактерий.

* Departments of Medicine, University of Wisconsin and William S. Middleton VA Hospital, Madison, Wisconsin, USA.

ОПТИМАЛЬНЫЕ ЭКСПОЗИЦИИ ЦЕФТАЗИДИМА МОГУТ ПРОГНОЗИРОВАТЬ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ И КЛИНИЧЕСКИЙ ИСХОДЫ У БОЛЬНЫХ С НОЗОКОМИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ.

OPTIMAL EXPOSURES OF CEFTAZIDIME PREDICT THE PROBABILITY OF MICROBIOLOGICAL AND CLINICAL OUTCOME IN THE TREATMENT OF NOSOCOMIAL PNEUMONIA / A. E. MULLER*, N. PUNT, J. W. MOUTON // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 4: 900—906.

Согласно доклиническим данным, показатель $\%fT > \text{МПК}$ цефтазидима коррелирует с микробиологическим исходом при инфекциях, вызванных грамотрицательными бактериями (ГОб), но клинических данных пока недостаточно. Было проверено соотношение между экспозицией цефтазидима и исходом у больных с нозокомиальной пневмонией по результатам 3 последних рандомизированных двойных слепых клинических испытаний 3-й фазы. Фармакокинетические (ФК) и демографические данные 3 клинических испытаний были использованы для построения популяционной ФК модели по принципу нелинейных смешанных эффектов. Индивидуальные графики «концентрация-время» и показатели ФК/ФД были определены для каждого больного. Значения МПК, используемые при анализе, были наибольшими для ГОб, определёнными в начале и конце лечения. Наиболее подходящей была двухчастевая модель, клиренс креатинина соответственно варьировал с клиренсом и возрастом в центральной части модели. Классификация и анализ древа регрессии показали величину пограничного значения, равную 44,9%, ($p < 0,0001$) для ГОб у 154 больных. Етах модель показала хорошее соответствие ($R^2 = 0,93$). Положительный результат адекватного лечения возрастал со скоростью эрадикации от 0,4848 при $\%fT > \text{МПК}$, равное 0%, до 0,9971 при 100%. EC_{50} составило 46,8%, EC_{90} — 95,5% $\%fT > \text{МПК}$. Экспозиция значительно коррелировала как с микробиологическим, так и клиническим исходами. Авторы заключают, что экспозиция с цефтазидимом может прогнозировать микробиологический и клинический исходы, а значение $\%fT > \text{МПК}$, необходимое для достижения благоприятного исхода, равно $>45\%$ интервала дозирования. Данное значение сходно с полу-

ченным на моделях животных и лежит в основе принципа, что адекватное дозирование может быть прогностическим фактором и индикатором благоприятного исхода лечения больных.

* Department of Medical Microbiology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, PO Box 9101, 6500 HB, Nijmegen, The Netherlands.

ОТКРЫТИЕ НОВОГО КЛАССА БОРСОДЕРЖАЩИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ, АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ.

DISCOVERY OF A NOVEL CLASS OF BORON-BASED ANTIBACTERIALS WITH ACTIVITY AGAINST GRAM-NEGATIVE BACTERIA / V. HERNANDEZ, T. CRÉPIN, A. PALENCIA, S. CUSACK, T. AKAMA, S. J. BAKER, W. BU, L. FENG, Y. R. FREUND, L. LIU, M. MEEWAN, M. MOHAN, W. MAO, F. L. ROCK, H. SEXTON, A. SHEORAN, Y. ZHANG, Y.-K. ZHANG, Y. ZHOU, J. A. NIEMAN, M. R. ANUGULA, EL M. KERAMANE, K. SAVARIRAJ, D. S. REDDY, R. SHARMA, R. SUBEDI, R. SINGH, A. O'LEARY, N. L. SIMON, P. L. DE MARSH, S. MUSHTAQ, M. WARNER, D. M. LIVERMORE, M. R. K. ALLEY*, J. J. PLATTNER // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY MARCH 2013; 57: 3: 1394—1403.

Грамотрицательные бактерии вызывают примерно 70% инфекций в отделениях интенсивной терапии. Всё возрастающее число возбудителей этих инфекций устойчиво к обычно применяемым антибиотикам и ко многим, находящимся на стадии разработки. Большинство разрабатываемых препаратов представляют собой модификацию лекарств существующих классов, которые только частично преодолевают известные механизмы устойчивости. Необходимы новые классы антибиотиков с новыми механизмами действия в отношении устойчивых грамотрицательных бактерий. Ранее был найден новый способ подавления аминоксил-тРНК синтетазы, лейцил-тРНК синтетазы (Лей-РС) у грибов с помощью механизма захвата (trapping) оксаборол-тРНК (OBORT). В настоящем исследовании, используя структурно модифицированный механизм OBORT, был разработан новый класс антибиотиков на основе бора, т. н. аминотилбензоксаборолы, подавляющих Лей-тРНК и активных в отношении грамотрицательных бактерий, имеющих основные механизмы выброса *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Главный аналог, AN3365, был активен в отношении грамотрицательных бактерий, включая Enterobacteriaceae, продуцирующих NDM-1 и КРС карбапенемазы, а также *P. aeruginosa*. Новый борсодержащий ан-

тибиотик AN3365 продемонстрировал хорошую фармакокинетику и эффективность на модельной инфекции бедра у мышей, вызванной *E.coli* и *P.aeruginosa*, что даёт основание предполагать возможное использование нового класса антибиотиков в медицинских целях.

* Anacor Pharmaceuticals Inc., Palo Alto, California, USA.

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ NAB739, НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ПОЛИМИКСИНА В ОТНОШЕНИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE NOVEL POLYMYXIN DERIVATIVE NAB739 TESTED AGAINST GRAM-NEGATIVE PATHOGENS / M. I. VAARA*, H. S. SADER, P. R. RHOMBERG, R. N. JONES, T. VAARA // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY 2013; 68: 3: 636–639.

Полимиксины, несмотря на нефротоксичность, вновь считаются препаратами последней линии терапии при лечении инфекций, обусловленных грамотрицательными бактериальными штаммами, устойчивыми к другим антибиотикам. NAB739 имеет одинаковую с полимиксином В (РМВ) циклическую структуру, но в линейной пептидной части содержит треонил-D-серинил вместо диаминобутирил-треонил-диаминобутирила, вследствие чего у него отсутствуют два положительных заряда, имеющих в линейной части РМВ. Сравнивали антибиотическую активность NAB739 и РМВ в отношении репрезентативной коллекции современных грамотрицательных бактерий. Были определены значения МПК у 310 клинических штаммов обоими референс-методами микроразведений (документ CLSI M07-A9, 2012). Значения МПК₉₀ NAB739 в подгруппе чувствительных к РМВ (МПК ≤ 2 мг/л) клинических штаммов *Escherichia coli* (n=51), *Klebsiella pneumoniae* (n=50), *Acinetobacter* spp. (n=49) и *Pseudomonas aeruginosa* (n=49) были равны 2, 2, 8 и 16 мг/л соответственно. У нечувствительных к РМВ штаммов *E.coli* (n=12), *K.pneumoniae* (n=11), *Acinetobacter* spp. (n=11) и *P.aeruginosa* (n=14) значения МПК₉₀ NAB739 составили ≥ 64 мг/л. Итак, у чувствительных к РМВ штаммов *E.coli* и *K.pneumoniae* значения МПК₉₀ NAB739 были соответственно, равны или вдвое превышали значения МПК РМВ. У аналогичных штаммов *Acinetobacter* spp. и *P.aeruginosa* значения МПК₉₀ NAB739 были соответственно в 4 и 8 раз выше значений МПК₉₀ РМВ. У нечувствительных к РМВ штаммов всех

видов бактерий значения МПК₉₀ NAB739 превышали значения МПК₉₀ РМВ в 2–4 раза.

* Northern Antibiotics Ltd, Eskolantie 1, FI-00720 Helsinki, Finland.

ОЦЕНКА АНТИКРИПТОКОККОВОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИМИКСИНА В IN VITRO И IN VIVO.

EVALUATION OF THE ANTICRYPTOCOCCAL ACTIVITY OF THE ANTIBIOTIC POLYMYXIN IN VITRO AND IN VIVO / B. ZHAI, X. LIN* // INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2013; 41: 3: 250–254.

Ранее сообщалось, что полимиксин В (РМВ), катионный липидный олигопептид, применяемый для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, обладает широким спектром антигрибковой активности и *in vitro* синергидно взаимодействует с азольными антимикотиками. Оценивали *in vitro* и *in vivo* эффективность РМВ в отношении *Cryptococcus neoformans* и изучали механизм гиперчувствительности данного гриба к РМВ. Было показано, что *in vitro* РМВ убивает как растущие, так и покоящиеся криптококковые клетки. Наличие характерной для *Cryptococcus* полисахаридной капсулы значительно усиливает чувствительность гриба к фунгицидному действию РМВ. Более того, РМВ на в/в и ингаляционной моделях криптококкоза у мышей был способен снижать грибковую нагрузку в тканях до уровня, сравнимого с достигнутым с помощью флуконазола. На основании полученных данных можно рассматривать РМВ в качестве дополнительного препарата выбора при лечении системного криптококкоза.

* Department of Biology, 3258 Texas A&M University, College Station, TX 77843-3258, USA.

КАТИОННЫЙ АНТИМИКРОБНЫЙ ПЕПТИД LL-37 ЭФФЕКТИВЕН В ОТНОШЕНИИ ВНЕ- И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

CATIONIC ANTIMICROBIAL PEPTIDE LL-37 IS EFFECTIVE AGAINST BOTH EXTRA- AND INTRACELLULAR STAPHYLOCOCCUS AUREUS / J. NOORE, A. NOORE, B. LI* // ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY 2013; 57: 3: 1283–1290.

Рост устойчивости бактерий к традиционным антибиотикам и угроза со стороны внутриклеточных бактерий, ответственных за хронические и рецидивирующие инфекции, требуют усовершенствованных препаратов, эффективно элими-

нирующих как вне-, так и внутриклеточные патогены. Определяли сравнительную бактерицидную эффективность катионного пептида LL-37 и традиционных антибиотиков в отношении *Staphylococcus aureus* вне- и внутриклеточной локализации на модельной инфекции остеобластов. Было установлено, что бактерицидная эффективность LL-37 в отношении внеклеточного *S. aureus* проявлялась в наномолярных концентрациях, тогда как лактоферрицин — только в микромолярных, а доксициклин и цефазолин — в миллимолярных. Бактерицидная эффективность LL-37 была неожиданно больше в отношении клинического штамма, чем штамма *S. aureus* ATCC. LL-37 также превосходил обычные антибиотики по элиминации внутриклеточного *S. aureus*, и, как показали кинетические исследования, элиминация вне- и внутриклеточного *S. aureus* происходила с большей скоростью. Итак, LL-37 активно и быстро элиминировал вне- и внутриклеточных *S. aureus*, а по бактерицидной эффективности превосходил обычно применяемые антибиотики, что позволяет рассматривать его как потенциальный препарат для лечения хронических и рецидивирующих инфекций, эффективно элиминирующий вне- и внутриклеточные патогенные бактерии.

* Department of Orthopaedics, School of Medicine, West Virginia University, Morgantown, West Virginia, USA.

СОЛИТРОМИЦИН ПОДАВЛЯЕТ СИНТЕЗ БЕЛКОВ И БИОГЕНЕЗ РИБОСОМ У *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* И *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*.

SOLITHROMYCIN INHIBITION OF PROTEIN SYNTHESIS AND RIBOSOME BIOGENESIS IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* AND *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* / W. RODGERS, A. D. FRAZIER, W. S. CHAMPNEY* // ANTIMICROBIAL AGENT CHEMOTHERAPY APRIL 2013; 57: 4: 1632—1637.

Постоянно растущее число устойчивых к антибиотикам микроорганизмов ведёт к поиску новых и усовершенствованию известных антибиотиков. Кетолиды, полусинтетические производные макролидов, эффективны в отношении некоторых устойчивых микроорганизмов. Солитромицин (СЕМ-101) является новым фторкетотетрациклином с повышенной антибиотической эффективностью. Он связывается с 50S субъединицей рибосомы и подавляет биосинтез белка. Подобно другим кетолидам, солитромицин нарушает образование рибосомальной субъединицы у бактерий. Этот механизм

действия установлен в отношении *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*. Средние 50% ингибирующие концентрации солитромицина $IS_{50}S$, подавляющие жизнеспособность клетки, синтез белка и скорость роста *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*, составляли 7,5; 40; 125 мкг/мл, соответственно. Формирование структуры 50S субъединицы у всех 3-х микроорганизмов снижалось при том же значении $IS_{50}S$. Снижение, измеренное методом мечения «пульс-чейз» у клеток, растущих в присутствии $IS_{50}S$ солитромицина, было равно 75%. Солитромицин умеренно стимулировал метаболизм 23S рРНК. Итак, показано, что солитромицин является весьма эффективным антибиотиком; по значению $IS_{50}S$ он сравним с телитромицином, а в отношении вышеуказанных микроорганизмов превосходит азитромицин и кларитромицин.

* Department of Biomedical Sciences, J. H. Quillen College of Medicine, East Tennessee State University, Johnson City, Tennessee, USA.

МЕМБРАНА КАК МИШЕНЬ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ВЫЗВАННОЙ ГИПЕРВИРУЛЕНТНОЙ ИНФЕКЦИИ, *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*.

THE MEMBRANE AS A TARGET FOR CONTROLLING HYPERVIRULENT *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* INFECTIONS / X. WU, P. T. CHERIAN, R. E. LEE, J. G. HURDLE* // JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY; 68: 4: 806—815.

Clostridium difficile ответственна за симптомы диареи преимущественно в стационарной фазе и в этот же период устойчива к бактерицидному действию антибиотиков. Исследовали возможность контролировать инфекцию *C. difficile*, нарушая функции клостридиальной мембраны, что приводит к быстрой гибели растущих и не растущих клеток. Определяли бактерицидное действие соединений, активных в отношении мембран, на культуры *C. difficile*, находящиеся в логарифмической и стационарной фазах роста, и сравнивали с действием известных антибиотиков. Также определяли их влияние на синтез АТФ, токсинов А/В и споруляцию. Было проверено влияние цекального содержимого грызунов на активность двух основных реутерициклинов, клофазимина, даптомицина и других антибиотиков сравнения в отношении *C. difficile*. Большинство мембрано-активных соединений и частично даптомицин демонстрировали зависимое от концентрации бактерицидное действие в отношении культур в логарифмической и стационарной фазах. В результате экспозиции клеток с МБК соединений

происходила быстрая потеря жизнеспособности, сопровождающаяся снижением в клетке АТФ, токсинов А/В и количества спор. За исключением низина, этот эффект не был связан с образованием пор в мембране. Интересно, что активность протонного ионофора нигерицина значительно увеличивалась, как только снижался рост *C. difficile*, что может свидетельствовать о важном значении протонного градиента для выживания не растущих клеток. Активность липофильных антибиотиков реутерициклинов и клофазимина снижалась под влиянием цекального содержимого. Результаты исследования означают, что *C. difficile* очень чувствительна к бактерицидному действию соединений, влияющих на функцию мембраны и биоэнергетику, а клостридиальная мембрана представляет собой новую мишень для антибиотиков, снижающих тяжесть *C. difficile* инфекций.

* Department of Biology, University of Texas at Arlington, Arlington, TX 76019, USA.

АНАЛИЗ РЯДА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ ВРЕМЕННЫХ ПЕРИОДОВ КАК СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАТЬ РОЛЬ ОГРАНИЧЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ В ПРОГРАММАХ ПО КОНТРОЛЮ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ НА ПРИМЕРЕ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ.

TIME SERIES ANALYSIS AS A TOOL TO PREDICT THE IMPACT OF ANTIMICROBIAL RESTRICTION IN ANTIBIOTIC STEWARDSHIP PROGRAMS USING THE EXAMPLE OF MULTIDRUG-RESISTANT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* / M. WILLMANN*, M. MARSCHAL, F. HÖLZL, K. SCHRÖPPEL, I. B. AUTENRIETH, S. PETER // *ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY* 2013; 57: 4: 1797—1803.

Хорошо известно, что существует связь между потреблением антибиотиков и устойчивостью неферментирующих грамотрицательных бактерий. Программами по контролю применения антибиотиков (Antibiotic Stewardship Programs, ASP) в обычной клинической практике предусматривается ограничение потребления антибиотиков в качестве инструмента, снижающего уровень устойчивости. Но остаётся невыясненным, каким образом ограничение сможет достичь этой цели и сможет ли вообще. Всё это ведёт к неопределённости при проектировании стратегий ASP. Для изучения ассоциации между потреблением антибиотиков и уровнем устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* в госпитале Тюбингенского университета (Тюбинген, Германия) было выполнено обсервационное исследование за период с января 2002 по декабрь 2011. Для определения указанных

ассоциаций и моделирования стратегий ограничения антибиотиков использовали модели перематочных функций. В условиях эксперимента была отмечена положительная связь между потреблением антибиотиков и устойчивостью. Сравнение различных стратегий по ограничению потребления антибиотиков показало, что для преодоления наблюдаемого повышения устойчивости требуется относительно небольшой объём вмешательства. Например, моделируемое ежегодное снижение потребления меропенема на 4% с 2009 по 2011 гг. дало в результате снижение на 62,5% (ДИ 95%, 15—110%) тенденции к росту *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью (устойчивость к 3—4 классам, 34MRGN-PA). Модели анализа предшествующих временных периодов могут стать инструментом для прогнозирования результатов стратегий по ограничению потребления антибиотиков, и использованы для создания схем ASP.

* Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Tübingen, Tübingen, Germany.

ВЛИЯНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ НА УСТОЙЧИВОСТЬ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* К КАРБАПЕНЕМАМ. КАКОВА РОЛЬ РАЗНООБРАЗИЯ ПРИМЕНЯЕМЫХ АНТИБИОТИКОВ?

IMPACT OF ANTIBIOTIC USE ON CARBAPENEM RESISTANCE IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*: IS THERE A ROLE FOR ANTIBIOTIC DIVERSITY? / C. PLÜSS-SUARD*, A. PANNATIER, A. KRONENBERG, K. MÜHLEMANN, G. ZANETTI // *ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY* 2013; 57: 4: 1709—1713.

Оценивали взаимосвязь между показателем устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам и количеством и набором используемых антибиотиков на основании данных, полученных из 20 больниц неотложной помощи 3 регионов Швейцарии за 2006—2010 гг. Основополагающим показателем настоящего исследования был уровень устойчивости *P. aeruginosa* к карбапенемам. Предполагаемыми прогностическими факторами были общее потребление антибиотиков и потребление карбапенемов, выраженное в DDD/100 койко-дней; пропорция антибиотиков с очень широким спектром и индекс Петерсона. Результаты исследования подтвердили корреляцию между использованием карбапенемов и уровнем устойчивости к ним на локальном (больница) и региональном уровнях. Расширение круга назначаемых антибиотиков может влиять на устойчивость *P. aeruginosa* за счёт 1) положительной корреляции между означенной устойчивостью и пропорцией потребления антибиотиков с очень

широким спектром активности (данные мульти-вариантного анализа; коэффициент = 1,77; 95% ДИ, 0,58—2,96; $p < 0,01$) и 2) отрицательной корреляции между устойчивостью и разнообразием применяемых антибиотиков (индекс гетерогенности Петерсона; коэффициент = -0,52; $p < 0,05$). Авторы заключают, что разнообразие и экономное (рациональное) использование антибиотиков представляют собой ценную стратегию минимизации распространения внутрибольничной устойчивости *P.aeruginosa* к карбапенемам.

* Service of Hospital Preventive Medicine, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland.

* School of Pharmaceutical Science, University of Geneva and University of Lausanne, Geneva, Switzerland.

**КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ПОТРЕБЛЕНИЕМ
КАРБАПЕНЕВ И УСТОЙЧИВОСТЬЮ
К КАРБАПЕНЕМАМ У ШТАММОВ
ENTEROBACTERIACEAE, ВЫДЕЛЕННЫХ
ОТ БОЛЬНЫХ С ИНТРААБДОМИНАЛЬНЫМИ
ИНФЕКЦИЯМИ В 5 МЕДИЦИНСКИХ ЦЕНТРАХ
ТАЙВАНЯ ЗА 2006—2010 ГГ.**

**CORRELATION BETWEEN CARBAPENEM
CONSUMPTION AND RESISTANCE TO CARBAPENEMS
AMONG ENTEROBACTERIACEAE ISOLATES COLLECTED
FROM PATIENTS WITH INTRA-ABDOMINAL
INFECTIONS AT FIVE MEDICAL CENTERS IN TAIWAN,
2006—2010 /M. HO, M.-W. HO, Y.-C. LIU, H.-S. TON, Y.-
L. LEE, Y.-M. LIU, C.-C. HUANG, P.-L. LU, C.-E. LIU,
Y.-H. CHEN, W.-C. KO, H.-J. TANG, K.-W. YU,
Y.-S. CHEN, Y.-C. CHUANG, J.-H. WANG*,
P.-R. HSUEH** // INTERNATIONAL JOURNAL
OF ANTIMICROBIAL AGENTS 2012;
40: SUPPL 1: S24—S28.**

Исследовали тенденцию развития устойчивости к карбапенемам у штаммов Enterobacteriaceae, выделенных от больных с интраабдоминальными инфекциями в 5 медицинских центрах Тайваня за 2006—2010 гг., и оценивали корреляцию между устойчивостью к карбапенемам и потреблением их в рамках программы SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). Основными видами возбудителей инфекций были *Escherichia coli* ($n=1095$), *Klebsiella* spp. ($n=663$) и *Enterobacter* spp. ($n=202$). За период исследования потребление эртапенема и общего количества карбапенемов (эртапенем, имипенем, меропенем) значительно возросло: с 6,13 до 13,38 и с 20,43 до 34,25 DDD/ 1000 койко-дней, соответственно. В период исследования чувствительность к эртапенему и имипенему всех штаммов варьировала: число не чувствительных к эртапенему штаммов было в пределах 3,5—10,3%, к имипенему — 3,5—10,7%. При росте потребления карбапенемов за указанный период времени заметного роста устойчивости к карбапенемам не было отмечено. Для проведения скорректированной политики назначения антибиотиков и выполнения интервенционных программ контроля за инфекцией необходим постоянный мониторинг тенденций развития устойчивости.

* Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, China Medical University Hospital, Taichung, Taiwan.

** Departments of Laboratory Medicine and Internal Medicine, National Taiwan University Hospital, National Taiwan University College of Medicine, No. 7 Chung-Shan S. Road, Taipei 100, Taiwan.

Подготовлено
Бондаревой Н. С.

ЦИКЛОФЕРОН®



- Первый российский низкомолекулярный индуктор интерферона
- Безопасность, надежность и доказанная эффективность
- Производится в соответствии с международным стандартом качества GMP

Самый быстрый индуктор интерферона

Корректор естественного иммунитета
Широкий спектр противовирусного действия

Форма выпуска:

раствор для инъекций
125 мг/мл в ампулах по 2 мл №5;
таблетки по 150 мг, покрытые
кишечнорастворимой оболочкой, № 10 (50)
линимент 5% тубы по 5 мл и 30 мл

Показания к применению:

Таблетки

(Reg№ 001049/02):
вирусные инфекции
(грипп, ОРЗ, гепатиты, герпес),
кишечные инфекции,
нейроинфекции

Инъекции

(Reg№ 001049/03):
вирусные инфекции,
заболевания передаваемые
половым путем, кишечные
инфекции, нейроинфекции

Линимент

(Reg№ 001049/01):
вагиниты, парадонтиты,
герпетическая инфекция
кожи и слизистых оболочек

Противопоказания:

беременность, период лактации,
повышенная чувствительность к
компонентам препарата,
детский возраст до 4-х лет,
декомпенсированный цирроз печени

мы создаем
УНИКАЛЬНОЕ

 ПОЛИСАН

191119, Россия, Санкт-Петербург,
Лиговский пр. д. 112.
Тел: + 7 (812) 710-82-25
E-mail: marketing@polysan.ru

ЛЕВОЛЕТ® Р



Левифлоксацин

Ответ на все вопросы!



Одобрено FDA¹

¹ www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Set_Current_Drug&AppNo=0767108&DrugName=LEVOFLOXACIN&ActiveIngredient=LEVOFLOXACIN&SponsorApplicant=DR%20REDDY'S%20LABS%20INC&ProductMktStatus=1

Качественный антибиотик с оптимальной дозировкой для лечения актуальных инфекционных заболеваний

Информация по медицинскому применению Леволет® Р

Фармакологическая группа: Хинолоны/фторхинолоны
Состав и форма выпуска:

Раствор для инфузий левифлоксацин 500 мг (5 мг/мл в ПЭ флаконе 100 мл). **Таблетки**, покрытые пленочной оболочкой – левифлоксацин по 250 и 500 мг, в блистере 10 шт.

Фармакодинамика

Блокирует ДНК-гиразу (топоизомеразу II) и топоизомеразу IV, нарушает суперспирализацию и сшивку разрывов ДНК, подавляет синтез ДНК, вызывает гибель бактериальной клетки. Левифлоксацин активен в отношении многих штаммов микроорганизмов.

Фармакокинетика

Фармакокинетика левифлоксацина при однократном и многократном введении препарата имеет линейный

характер. Плазменный профиль концентраций левифлоксацина после в/в введения аналогичен таковому при приеме таблеток. Поэтому пероральный и внутривенный пути введения могут считаться взаимозаменяемыми. При приеме внутрь быстро и практически полностью всасывается (прием пищи мало влияет на скорость и полноту абсорбции). Биодоступность – 99%. T_{max} – 1–2 ч. Хорошо проникает в органы и ткани: легкие, слизистую оболочку бронхов, мокроту, органы мочеполовой системы, полиморфно-ядерные лейкоциты, альвеолярные макрофаги. В печени небольшая часть окисляется и/или дезацетируется.

Выводится из организма преимущественно почками путем клубочковой фильтрации и канальцевой секреции. T_{1/2} при приеме таблеток – 6–8 ч. После разового в/в

введения в дозе 500 мг T_{1/2} составляет (6,4±0,7) ч. Почечный клиренс составляет 70% общего клиренса.

Показания и способ применения и дозы

Инфекционно-воспалительные заболевания легкой и средней степени тяжести, вызванные чувствительными к препарату возбудителями. Дозы определяются характером и тяжестью инфекции, а также чувствительностью предполагаемого возбудителя. В/в введение должно осуществляться в течение не менее 60 мин.

Противопоказания

Повышенная чувствительность к левифлоксацину или другим хинолонам, эпилепсия, возраст до 18 лет, беременность, лактация.

Более подробная информация о препарате Леволет® Р содержится в инструкции по применению.

Данный рекламный материал распространяется Представительством фирмы «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.», Москва, Овчинниковская наб., 20, стр. 1; тел. (495) 795-39-39; www.drreddys.ru; e-mail: inforus@drreddys.com
Представлена краткая информация по препарату Леволет Р. С полной инструкцией по применению можно ознакомиться на сайте www.drreddys.ru

Регистрационный номер: ЛСР-005809/09, ЛСР-006904/09
РЕКЛАМА. Информация для медицинских и фармацевтических работников.